PARTIELLE REINIGUNG UND CHARAKTERISIERUNG DES INSULINREZEPTORS AUS RATTENLEBERMEMBRANEN

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

Rüdiger Koch

aus Kassel

1981

PARTIELLE REINIGUNG UND CHARAKTERISIERUNG DES INSULINREZEPTORS AUS RATTENLEBERMEMBRANEN

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

Rüdiger Koch

aus Kassel

1981

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Diese Arbeit wurde am Physiologisch-chemischen Institut der Universität Tübingen in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. U. Weber durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. U. Weber danke ich für die Überlassung des Themas und die stete Unterstützung der Arbeit.

Meinen Laborkollegen, Herrn Dipl.-Biochem. Karl-Norbert Klotz und Herrn Dipl.-Biochem. Günter Müller, danke ich für die gute Zusammenarbeit und viele Diskussionen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn cand. biochem. Arno Deger, Herrn cand. biochem. Hans-Martin Jäck und Herrn cand. biochem. Sørge Kelm für ihre wertvolle Hilfe bei der Durchführung der Versuche.

A B S T R A C T

KOCH, RÜDIGER:

PARTIELLE REINIGUNG UND CHARAKTERISIERUNG DES INSULINREZEPTORS AUS RATTENLEBERMEMBRANEN

Der Insulinrezeptor aus Rattenleber wird mit Triton X-100 aus den Membranen herausgelöst und mittels Gelfiltration an Sepharose 4B CL, Behandlung mit Con A-Sepharose im Batch-Verfahren sowie einer neu entwickelten Fällungsmethode mit Concanavalin A vom Hauptteil der Extraktproteine einschließlich der Insulin-Abbauaktivität abgetrennt und auf diese Weise partiell gereinigt. Die Rezeptoraktivität läßt sich durch Gelfiltration in 2 Komponenten mit einem Stokes'Radius von 91 Å (Peak I) und 79 Å (Peak II) auftrennen. Peak I zeigt bei 4°C optimale Insulinbindung bei pH 8,0 und hoher Ionenstärke, bei niedriger Ionenstärke bindet er kein Insulin. Das Bindungsoptimum von Peak II liegt bei niedriger Ionenstärke bei pH 7,2, bei hoher Ionenstärke bei pH 8,0. Für die Insulinbindung beider Peaks erhält man nichtlineare Scatchard-Diagramme, die sich in einen hochaffinen und einen niederaffinen Bindungsanteil zerlegen lassen. Die Dissoziationskonstanten des hochaffinen Bindungsanteils sind jeweils pH- und Ionenstärke-abhängig, an den Bindungsoptima bei 4°C (s.o.) betragen sie $7{,}8 \cdot 10^{-10}$ M (Peak I), $7{,}8 \cdot 10^{-10}$ M (Peak II bei niedriger Ionenstärke) und $1{,}89 \cdot 10^{-9}$ M (Peak II bei hoher Ionenstärke). SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophoresen nach Photoaffinitätsmarkierung der Rezeptoraktivität von Peak I und Peak II ergibt für Peak I ohne Reduktion 5 Banden vom Molekulargewicht (MG) 245.000 - 407.000, für Peak II 2 Hauptbanden mit MG 210.000 und 132.000. Bei Reduktion mit Dithioerythrit zeigen beide Peaks nur noch die Bande mit MG 132.000 sowie eine Nebenbande mit MG 120.000. Es wird geschlossen, daß die Rezeptorspezies von Peak II ein Teil der Rezeptorspezies von Peak I ist und durch reduktive Abspaltung eines nicht-insulinbindenden Effektoranteils aus dieser hervorgeht. Verschiedene Rezeptormodelle werden diskutiert.

I N H A L T

		Seite
1.	EINLEITUNG	1
1.1.	Funktion des Insulinrezeptors	1
1.2.	Eigenschaften des Insulinrezeptors	4
1.3.	Aufgabenstellung	6
2.	ABKÜRZUNGEN UND SCHREIBWEISEN	8
3.	MATERIAL UND GERÄTE	9
4.	METHODEN	11
4.1.	Reinigung von Insulin	11
4.2.	Präparation von ^{125}J-Insulin	11
4.2.1.	Durchführung der Insulin-Jodierung	11
4.2.2.	Optimierung des ^{125}J-Einbaues	13
4.3.	Präparation von Lebermembranextrakt	13
4.4.	^{125}J-Insulin-Bindungstest	16
4.4.1.	Durchführung und Auswertung des Bindungstests	16
4.4.2.	Einstellung von pH und Ionenstärke im Bindungstest	17
4.5.	Bestimmung des Insulinabbaues	18
4.6.	Proteinbestimmung	18
4.7.	Gelfiltrationen	19
4.7.1.	Reinigung des Rezeptors mittels Gelfiltration	19
4.7.2.	Molekulargewichtsbestimmung mittels Gelfiltration	19
4.7.3.	Gelfiltration des photoaffinitätsmarkierten Rezeptors	20
4.8.	Con A-Sepharose-Behandlung von Membranextrakt	20
4.9.	Con A-Fällung von Membranextrakt	21
4.10.	Photoaffinitätsmarkierung des Rezeptors	21
4.10.1.	Präparation von ^{125}J-MABI	22
4.10.2.	Durchführung der Photoaffinitätsmarkierung	23
4.11.	SDS-PAGE	24
4.11.1.	Durchführung der SDS-PAGEn	24

4.11.2. Molekulargewichtsbestimmung mittels SDS-PAGE 26

5. ERGEBNISSE 27

5.1. Inhibitoren des Insulinabbaues 27

5.2. Gelfiltration von Membranextrakt an Sepharose 4B CL 32

5.2.1. Auftrennung in Rezeptorpeak, Insulin-Abbaupeak und Proteinpeak 32

5.2.2. Untersuchung des Insulin-Abbaupeaks 35

5.2.3. Untersuchung des Rezeptorpeaks 37

5.3. Con A-Sepharose-Behandlung von Membranextrakt 39

5.3.1. Durchführung der Con A-Sepharose-Behandlung 39

5.3.2. Auswertung der Con A-Sepharose-Behandlung 43

5.4. Con A-Fällung von Membranextrakt 46

5.4.1. Durchführung der Con A-Fällung 46

5.4.2. Auswertung der Con A-Fällung 51

5.4.3. Einfluß von Con A auf die Insulin-Rezeptor-Bindung 55

5.5. Auftrennung der Rezeptoraktivität mittels Gelfiltration in Peak I und Peak II 56

5.6. Stabilität von Peak I, Peak II und der Insulin-Abbauaktivität 62

5.7. pH- und Ionenstärkeabhängigkeit der Insulinbindung von Peak I und Peak II 64

5.7.1. pH- und Ionenstärkeabhängigkeit bei 4°C 64

5.7.2. pH- und Ionenstärkeabhängigkeit bei 23°C und 37°C 68

5.7.3. Kontamination von Peak II durch Peak I ? 72

5.8. Scatchard-Analysen der Insulinbindung von Peak I und Peak II 74

5.9. Molekulargewichtsbestimmung von Peak I, Peak II und dem Insulin-Abbaupeak mittels Gelfiltration 79

5.10. Gelfiltration von photoaffinitätsmarkiertem Peak I und Peak II 82

5.11. SDS-PAGE von Peak I und Peak II 85

5.11.1. SDS-PAGE an Rundgelen 85

5.11.2. SDS-PAGE an Flachgelen 88

5.11.3. SDS-PAGE und Anfärbung verschiedener Rezeptorpräparate 93

5.11.4. Molekulargewichtsbestimmungen mittels SDS-PAGE 95

6. DISKUSSION 98

6.1. Partielle Reinigung des Insulinrezeptors 98

6.2. Untersuchung der Insulin-Abbauaktivität 99

6.3. Homogenität von Peak I und Peak II 100

6.4. pH- und Ionenstärkeabhängigkeit der Insulinbindung von Peak I und Peak II 101

6.5. Scatchard-Diagramme der Insulinbindung von Peak I und Peak II 104

6.6. Molekulargewichtsbestimmungen von Peak I und Peak II und ihrer Untereinheiten 106

6.7. Modelle des Insulinrezeptors 113

7. ZUSAMMENFASSUNG 118

8. LITERATUR 120

1. EINLEITUNG

1.1. FUNKTION DES INSULINREZEPTORS

Nach heutigem Erkenntnisstand besteht der erste Schritt der Insulinwirkung an einer Zielzelle in der Bindung des Hormons an die Insulinrezeptoren der Plasmamembran. Dabei versteht man unter Hormonrezeptoren Proteine, die ein Hormon reversibel binden und dieses Signal zur Auslösung der entsprechenden Hormonwirkung weiterleiten. Insulinrezeptoren wurden beim Menschen und einer Reihe von Tieren in fast allen Geweben gefunden (25,41,72,75). Die Schritte nach der Insulinbindung an den Membranrezeptor sind erst teilweise geklärt, grundsätzlich jedoch scheint der gebildete Insulin-Rezeptor-Komplex Ausgangspunkt von drei Prozessen zu sein: der Auslösung der biologischen Wirkung, der Signaltermination (Insulin-Abbau) und der Regulation der Rezeptoraktivität.

Für die Auslösung der verschiedenen Insulinwirkungen scheint es keinen generellen Mechanismus zu geben. So hat sich eine Funktion von cAMP als second messenger nur in wenigen Fällen nachweisen lassen, viele Insulinwirkungen erfolgen dagegen cAMP-unabhängig (26,61). Ebenso ist auch eine Vermittlung durch cGMP oder Ionen (Ca^{++}, Na^{+}, K^{+}) jeweils auf bestimmte Insulinwirkungen begrenzt (26). Ohne Zwischenschaltung eines second messenger scheint die Stimulation des Hexose-Transportes durch Insulin in Fett- und Muskelzellen abzulaufen: hier kommt es nach Insulin-Einwirkung zur Oxidation membranständiger SH-Gruppen (26,27), wodurch sich auch der insulinähnliche Einfluß von H_2O_2, Vitamin K und Diamid erklären läßt. Schließlich wurden auch Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungsreaktionen beobachtet, so an Membranproteinen von Fettzellen (26) und Leberzellen (99). Die Dephosphorylierung und damit Aktivierung der Pyruvat-Dehydrogenase und der Glycogen-Synthase scheint dabei durch einen Mediator vermittelt zu werden, der unter Insulineinfluß in der Plasmamembran gebildet wird und in Muskelextrakt (94) und Fettzellextrakt (81,129) nachgewiesen werden konnte.

Bei der Aufstellung des Second-messenger-Modells ging man seinerzeit davon aus, daß Insulin seine Wirkung nur über die Rezeptoren der Zellmembran entfaltet. Es stellte sich jedoch heraus, daß Insulin auch in die Zelle aufgenommen (internalisiert) wird (4,13,50,52,63,100,132). In Versuchen unter anderem mit fluoreszenzmarkiertem Insulin (126) und mittels elektronenmikroskopischer Autoradiografie (4,13,52) konnte gezeigt werden, daß dabei eine zeit-, temperatur- und energieabhängige Endocytose des Insulin-Rezeptor-Komplexes stattfindet. Es ist noch nicht geklärt, ob die Rezeptoren für diesen Prozess als Cluster in der Zellmembran vorliegen müssen (63, 76,126). Das internalisierte Insulin wird schon nach kurzer Zeit assoziiert an lysosomale Strukturen (13,52), möglicherweise auch an Golgi-Strukturen (4), wiedergefunden. Man nimmt an, daß die endocytotischen Vesikel mit den Lysosomen verschmelzen, in denen dann der Abbau des Insulins stattfindet. Die Abbaufragmente werden ins umgebende Medium abgegeben. Wird der lysosomale Abbau durch Chloroquin oder NH_4Cl gehemmt, reichert sich intaktes Insulin in den Lysosomen an (52,100). Der zusammen mit Insulin internalisierte Rezeptor wird entweder ebenfalls abgebaut oder wieder in die Membran eingebaut.

Für die Bedeutung dieses Internalisierungsvorganges gibt es verschiedene Erklärungen. So könnte die Internalisierung eine Funktion im Wirkungsmechanismus von Insulin haben. Von einigen Arbeitsgruppen wurden Insulinrezeptoren auch innerhalb der Zelle nachgewiesen, lokalisiert im Golgi-Apparat (3,120), dem Endoplasmatischen Retikulum (138) und der Kernmembran (47,48,64,138). Es wurde postuliert, daß Insulin nach der Internalisierung einen Teil seiner Wirkungen über diese Rezeptoren entfaltet. Allerdings erscheint es fraglich, ob Insulin die intrazellulären Rezeptoren auf dem Weg der Internalisierung in intaktem Zustand erreicht. Steiner (132) stellte dagegen zur Diskussion, daß die Wirkung von Insulin über Insulinfragmente erfolgen könnte, die nach Internalisierung in den Lysosomen gebildet werden und dann intrazellulär die Auslösung der verschiedenen Insulineffekte vermitteln. Diese Hypothese ist jedoch unwahrscheinlich, da verschiedene Insulinwirkungen

auch nach Hemmung des lysosomalen Abbaus durch Chloroquin nachgewiesen wurden (52,102) und außerdem auch Anti-Rezeptor-Antikörper (s.u.) und Concanavalin A Insulin-Aktivität besitzen, obwohl beide vermutlich keine Insulin-Sequenzen enthalten.

Wahrscheinlicher als eine Beteiligung am Wirkungsmechanismus von Insulin ist dagegen die Bedeutung der Internalisierung für die Signaltermination durch lysosomalen Abbau des Insulins.

Lange Zeit wurde diskutiert, ob die Bindung und der Abbau von Insulin zwei voneinander unabhängige Prozesse sind (40) oder miteinander gekoppelt sind (132,135). Beide Auffassungen scheinen richtig zu sein. So ist der Abbau von Insulin in den Lysosomen rezeptor-vermittelt, da der Insulin-Rezeptor-Komplex vorher internalisiert werden muß. Dementsprechend findet man an Zellen in der Regel eine Kopplung und Parallelität von Bindung und Abbau (2,50,52,63,101,132,135). Untersucht man dagegen Gewebehomogenate oder Membranextrakte, so lassen sich deren Abbauaktivitäten von den Rezeptoraktivitäten trennen, bei Membranextrakten z.B. über chromatografische und elektrophoretische Verfahren (57,78,89,93,140).

Man kennt inzwischen einige der insulinabbauenden Enzyme genauer: es handelt sich um die Glutathion-Insulin-Transhydrogenase (137) und verschiedene Proteasen cytosolischen, lysosomalen und mikrosomalen Ursprungs (1,9,36,147). Die gefundenen Enzyme unterscheiden sich vom Rezeptor unter anderem durch ihren K_m-Wert und ihr pH-Optimum. Der Rezeptor seinerseits baut Insulin nicht ab, gebundenes Insulin läßt sich stets intakt vom Rezeptor dissoziieren. Bindung und Abbau erfolgen also durch verschiedene voneinander unabhängige Moleküle. Welche Aufgaben die einzelnen Abbauenzyme in der intakten Zelle haben und ob sie, wie für die lysosomalen Enzyme angenommen, ebenfalls bei der Signaltermination mitwirken, ist noch unbekannt.

Die Internalisierung des Insulin-Rezeptor-Komplexes scheint schließlich auch die Ursache für die Verminderung der Rezeptorzahl bei Zellen nach längerer Einwirkung von Insulin zu

sein. Dieses Phänomen ("Down regulation") wurde inzwischen in vitro an verschiedenen Zellsystemen gefunden (5,44,86,101). Es spielt vermutlich als Regulationsmechanismus auch in vivo eine große Rolle bei pathologischen Zuständen wie Fettleibigkeit oder bestimmten Formen des Diabetes mellitus, die mit Hyperinsulinämie verbunden sind (72,77,113). Man beobachtet hier an den Geweben ebenfalls eine Verminderung der Rezeptorzahl, die mitverantwortlich für eine meist gleichzeitig auftretende Insulinresistenz zu sein scheint.

In einem anderen Fall von Insulinresistenz (Acanthosis nigricans Typ B) wurde als Ursache das Auftreten von Antikörpern gegen den Insulinrezeptor gefunden (39,49,58). Diese Anti-Rezeptor-Antikörper gewinnen in letzter Zeit zunehmend an Interesse, da sie bei der Aufklärung des Wirkungsmechanismus von Insulin (2,76,127,129) und zur Rezeptorreinigung über Immunpräzipitation (56,58,136,146) eingesetzt werden können.

1.2. EIGENSCHAFTEN DES INSULINREZEPTORS

Alle bisherigen Untersuchungen ergaben, daß sich die Insulinrezeptoren der verschiedenen Gewebe in ihren Eigenschaften sehr ähnlich sind (25,41,72,75). Man findet auch keine Veränderung dieser Eigenschaften, wenn man von ganzen Zellen zu Membranpräparationen übergeht oder die Rezeptoren mit nichtionischen Detergentien wie Triton X-100 aus den Membranen herauslöst. Ausgehend von solchen Tritonextrakten wurden die Insulinrezeptoren verschiedener Gewebe inzwischen in unterschiedlichem Grade gereinigt. Als Reinigungs- und Trennverfahren wurden dabei eingesetzt: Gelfiltration an Sepharose 4B und 6B (20,45,46,59,66,67,78,105,106,118,124,133,140), Affinitätschromatografie an Con A-Sepharose (23,67,78,107,140) und WGA-Sepharose (57,136), Affinitätschromatografie an Insulin-Sepharose (22,46,66,67,104-107), Ionenaustausch-Chromatografie an DEAE-Cellulose (14,22,46), Adsorptionschromatografie an Hydroxyapatit (14,140), PAGE (87,88,89,90,93,140), Isoelektrische Fokussierung (67,78), Ammonsulfatfällung (22,104) sowie Immunpräzipitation (2,56,57,59,136,146) und Immun-Affinitätschromatografie (59).

Die Dissoziationskonstanten der Insulin-Rezeptor-Bindung liegen zwischen 10^{-10} M und 10^{-7} M. Mit allen Rezeptorpräparationen, auch den (partiell) gereinigten erhält man in der Regel nichtlineare Scatchard-Diagramme mit K_D-Werten von 10^{-10} - $5 \cdot 10^{-9}$ M für den hochaffinen und von $5 \cdot 10^{-9}$ - 10^{-7} M für den niederaffinen Bindungsanteil. Die Nichtlinearität der Scatchard-Diagramme wird auf negative Kooperativität (30,32), Heterogenität der Bindungsstellen (74) oder beides zusammen (114,115) zurückgeführt. Als Beweis für das Vorliegen negativer Kooperativität wird die in Anwesenheit von Insulin beschleunigte Dissoziation des Insulin-Rezeptor-Komplexes angeführt (30,32), jedoch ist dieser Beweis umstritten (119). Die Insulin-Rezeptor-Bindung besitzt in den meisten Fällen ein pH-Optimum von pH 7,6 - 8,2. Sie zeigt eine starke Temperaturabhängigkeit mit zunehmender Bindung bei abnehmender Temperatur.

Die Bindungsfähigkeit des Insulinrezeptors wird durch Trypsin und andere Proteasen zerstört, während Phospholipase A und C, Neuraminidase und andere Glycosidasen, möglicherweise mit Ausnahme von β-Galaktosidase, keinen Einfluß haben (10, 11,12,15,20,55,78).

Der Insulinrezeptor besitzt einen Kohlenhydratanteil, wie die folgenden Ergebnisse zeigen: Er bindet an Con A-Sepharose und WGA-Sepharose (und läßt sich so anreichern). Sein Laufverhalten in der SDS-PAGE ist nach Behandlung mit Neuraminidase und anderen Glycosidasen verändert (57,69,70,136,146). Schließlich wird die Insulin-Rezeptor-Bindung durch die Anwesenheit verschiedener Lectine wie Con A (6,10,12,24,31,62,79), WGA (11, 24,97) und galaktose-spezifischer Lectine (11,12) gestört. Daraus läßt sich schließen, daß der Kohlenhydratanteil des Rezeptors Mannose, Galaktose, N-Acetyl-Glucosamin und Sialinsäuren enthält. Er scheint jedoch nicht direkt an der Insulin-Rezeptor-Bindung beteiligt zu sein, wie deren Glycosidase-Unempfindlichkeit beweist.

Zur Untersuchung der Größe des Rezeptors sowie seines Aufbaues aus Untereinheiten wurden in neuerer Zeit verschiedene Techniken zur Rezeptormarkierung eingesetzt. Dazu zählen die

Photoaffinitätsmarkierung mit ^{125}J-Insulin-Derivaten, die eine photoreaktive Gruppe tragen (68,90,141,143,145), die Vernetzung (crosslinking) von ^{125}J-Insulin und Rezeptor mit Disuccinimidyl-Suberat (14,28,59,103,117), die Markierung des Rezeptors mit ^{125}J nach der Lactoperoxidase-Methode (57,92) bzw. der Chloramin T-Methode (68) sowie die biosynthetische Markierung des Rezeptors mit ^{35}S-Methionin (136) und mit "schweren" Aminosäuren (^{2}H, ^{13}C, ^{15}N) (122).

Für den nativen Insulinrezeptor wird von den meisten Autoren ein Molekulargewicht um 300.000 angegeben, entsprechend einem Stokes'Radius von ca. 72 Å (20,45,67,78,105,118,140) und einer Sedimentationskonstanten von 11 S (20). In einigen Fällen wurden jedoch auch höhere Molekulargewichte gefunden (54,90, 93). Als isoelektrischer Punkt des Rezeptors werden 5,6 (78), 4,0 (67) und 4,1 (142) genannt. Nach SDS-PAGE wurden Rezeptorbanden mit Molekulargewichten von 40.000 bis 350.000 erhalten, je nachdem, ob und in welcher Stärke die Rezeptorprobe vor der Elektrophorese mit Dithiothreit reduziert wurde (28,68,69,103, 118). Einen Überblick über alle bisher gefundenen Ergebnisse zur Größe des Rezeptors und seiner Untereinheiten gibt Tabelle 6 im Diskussionsteil (6.6.). Dort werden ebenfalls die aus diesen Daten abgeleiteten Rezeptormodelle (29,45,105) ausführlich besprochen.

Über die Struktur der Insulin-Rezeptor-Bindung lassen sich noch kaum Aussagen machen. Für das Insulinmolekül wird neben einer Region, die an der Rezeptor-Bindung beteiligt ist (8,121), eine Region beschrieben, die für die Auslösung der negativen Kooperativität verantwortlich sein soll (33). Von seiten des Rezeptors ist die Beteiligung von Tyrosin und Histidin an der Insulin-Bindung wahrscheinlich (19). Grundsätzlich sollen hydrophobe Wechselwirkungen für den Bindungsvorgang eine große Rolle spielen (139).

1.3. AUFGABENSTELLUNG

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Untersuchung des Insulinrezeptors aus Rattenleber. Der Rezeptor wird dazu mit Triton X-100 aus den Lebermembranen herausgelöst und mittels

Gelfiltration, Behandlung mit Con A-Sepharose sowie Fällung mit Con A (85) partiell gereinigt. Anschließend werden insbesondere die folgenden Bindungs- und Struktureigenschaften untersucht: Dissoziationskonstanten, Form der Scatchard-Kurven (Nichtlinearität), pH- und Ionenstärkeabhängigkeit der Insulin-Rezeptor-Bindung, Heterogenität der Rezeptoraktivität bei Gelfiltration, Aufspaltung in Untereinheiten bei SDS-PAGE unter reduzierenden und nichtreduzierenden Bedingungen, Molekulargewicht des nativen Rezeptors und seiner Untereinheiten. Ein Teil der Strukturuntersuchungen wird dabei mit photoaffinitätsmarkiertem Rezeptor durchgeführt. Aus den Resultaten werden abschließend einige Hypothesen zu einem Modell des Insulinrezeptors entwickelt.

Verschiedene Versuche zu Beginn der Arbeit befassen sich zusätzlich mit der bei der Rezeptorreinigung abgetrennten Insulin-Abbauaktivität.

2. ABKÜRZUNGEN UND SCHREIBWEISEN

Abkürzungen:

Triton	Triton X-100
Extrakt	Tritonextrakt aus Rattenlebermembranen
PEG	Polyäthylenglycol 6.000
TCA	Trichloressigsäure
Con A	Concanavalin A
WGA	Weizenkeim-Agglutinin
MeMan	α-Methyl-D-Mannosid
SDS	Na-Dodecylsulfat
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
Bis	N,N'-Methylenbisacrylamid
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin
DTE	Dithioerythrit
GSH	Glutathion reduziert
EDTA · Na_2	Äthylendiamintetraessigsäure, Na-Salz
NEM	N-Äthylmaleimid
^{125}J-MABI	$N^{\varepsilon B29}$-Mono(4-Azidobenzoyl)-^{125}J-Insulin
^{125}J-DABI	$N^{\alpha A1}, N^{\varepsilon B29}$-Di(4-Azidobenzoyl)-^{125}J-Insulin
KNaPP	Kalium-Natrium-Phosphatpuffer (hergestellt mit $Na_2HPO_4 \cdot 12\ H_2O$ und KH_2PO_4)
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan
MG	Molekulargewicht
cpm	Impulse pro Minute
rpm	Umdrehungen pro Minute
M	molar (Mol / Liter)

Konstanten:

K_{50}, K_D, BK	vgl. 4.4.1.
K_{av}	vgl. 4.7.2.
R_F	vgl. 4.11.2.

Schreibweisen (Beispiele):

0,1% Extrakt: Extrakt mit einem Tritongehalt von 0,1%

0,1 M KNaPP pH 7,4/ 0,1% Triton/ 0,1% Albumin: 0,1 M KNaPP pH 7,4 mit einem Gehalt von 0,1% Triton und 0,1% Albumin

Alle in dieser Arbeit genannten Prozentzahlen sind %(w/v), nur Triton- und TEMED-Konzentrationen werden in %(v/v) angegeben.

3. MATERIAL UND GERÄTE

Substanzen:

Rinder-Insulin (zinkhaltig, 25 U/mg) wurde von Brunnengräber, Lübeck, bezogen.

Albumin aus Rinderserum (lyoph., min. 92%), γ-Globulin aus Rinderserum (lyoph., > 98%), Triton X-100 (p.a.), Polyäthylenglycol 6.000 (pract.), Concanavalin A (krist., reinst), N-Äthylmaleimid (reinst, min. 99%), p-Chlormercuribenzoesäure, Na-Salz (rein), Bacitracin (pharm.), Coomassie Brillant Blue R-250 (rein), Na-Dodecylsulfat (krist., reinst, min. 99%), N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin (rein), Bromphenolblau, Na-Salz (reinst), Glycin (p.a.) und Dithioerythrit (reinst) wurden von Serva, Heidelberg, bezogen.

$Na^{125}J$ (1 mCi/10 µl) wurde von Amersham-Buchler, Braunschweig, bezogen.

Trizma Base, Trizma 8,7, α-Methyl-D-Mannosid (Grade III, 99%), α-Methyl-D-Glucosid und 2,6-Dichlorphenol-Indophenol (Grade I) wurden von Sigma, München, bezogen.

Acrylamid (speziell gereinigt für die Elektrophorese) und N,N'- Methylenbisacrylamid (speziell gereinigt für die Elektrophorese, vor Gebrauch 1× aus Aceton umkristallisiert) wurden von BDH, England, bezogen.

2-Mercaptoäthanol (p.a.) und o-Phenanthroliniumchlorid Monohydrat (p.a.) wurden von Merck, Darmstadt, bezogen.

Glutathion, reduziert "Waldhof" wurde von Papierwerke Waldhof Aschaffenburg AG, Waldhof, bezogen.

Trasylol (10.000 KIE/ml) wurde von Bayer, Leverkusen, bezogen.

Säulenmaterialien:

Sepharose 4B CL, Sepharose 6B CL, Sephadex G 50 fine, Con A-Sepharose und SP-Sephadex C 25 wurden von Deutsche Pharmacia, Freiburg, bezogen.

Molekulargewichts-Standards:

Von Deutsche Pharmacia, Freiburg, wurden bezogen: Thyroglobulin, Ferritin, Katalase und Aldolase (aus dem Gelfiltrations-Eichkit für hohe Molekulargewichte).

Von Sigma, München, wurden bezogen: Chymotrypsinogen aus Rinderpankreas (6× krist., Type II), Ovalbumin (Grade VI, ~ 99%), Dextranblau.
Von Serva, Heidelberg, wurden bezogen: Thyroglobulin vom Schwein (lyoph., rein), Albumin aus Rinderserum (lyoph., min. 92%), Dithioerythrit (reinst).
Von Boehringer, Mannheim, wurden bezogen: Katalase aus Rinderleber, Aldolase aus Kaninchenmuskel, Eichkit für SDS-PAGE (RNA-Polymerase, Albumin, Trypsin-Inhibitor).
Von BDH, England, wurde bezogen: Eichkit für SDS-PAGE (Molekulargewichtsbereich 56.000 - 280.000).

Geräte:

Gammazähler:
Automatischer Gammazähler MR 480 von Kontron, München.

Zentrifugen:
Kühlzentrifuge J 21 B von Beckman, München.
Ultrazentrifuge L5-65 von Beckman, München.
Minifuge 2 von Heraeus-Christ, Osterode.
Servall Tischzentrifuge Automatic Superspeed von Hormuth/Vetter, Heidelberg-Wiesloch.

Fraktionssammler:
2112 RediRac mit Uvicord II von LKB, Karlsruhe.
7000 Ultrorac mit Uvicord II von LKB, Karlsruhe.

pH-Meter:
Digital pH Meter von Bachofer, Reutlingen.

Stromversorgung für Elektrophorese:
Vokam 2541 und Vokam SAE 2761 von Shandon, London.

Geltrockner:
Aldo-Xer von Schütt, Göttingen.

Die Elektrophoresekammern und der Gelschneider waren in der Werkstatt des Instituts hergestellt worden.

4. METHODEN

4.1. REINIGUNG VON INSULIN (84)

Rinderinsulin wurde in Ammoniumacetat-Puffer pH 7,6 gelöst und mit 1 mM EDTA · Na_2 entzinkt. Die Lösung wurde gegen H_2O dialysiert und lyophilisiert. Zur Reinigung wurden 250 mg entzinktes Insulin auf eine Säule (Sephadex G 50 fine, 4 × 100 cm) aufgetragen und mit 1 N Essigsäure eluiert.

4.2. PRÄPARATION VON ^{125}J-INSULIN

Die Jodierung von Insulin erfolgte mit Chloramin T nach der Methode von Hunter und Greenwood (65), modifiziert nach (18, 84).

4.2.1. Durchführung der Insulin-Jodierung

Die Reaktion wurde bei Raumtemperatur durchgeführt. In ein Plastikreagensglas (12 × 75 mm) wurden pipettiert:

1 mCi $Na^{125}J$ in 10 µl Volumen
+ 100 µl 0,1 M KNaPP pH 7,4
+ 10 µl gereinigtes Insulin in 0,1 M KNaPP pH 7,4 (0,4 mg/ml)
+ 20 µl Chloramin T in H_2O (1 mg/ml).
40 sec. unter Rühren (Vortex) reagieren lassen, dann
+ 20 µl $Na_2S_2O_5$ in H_2O (3 mg/ml).

Vortexen, dann sofort
+ 10 µl 0,1 M KNaPP pH 7,4/ 0,5% Triton/ 2% Albumin.
Vortexen.

Nach 10 min. wurden die 170 µl Reaktionsgemisch auf eine Säule (Sephadex G 50 fine, 1,3 × 50 cm) aufgetragen, das Reaktionsglas mit 50 µl 0,1 M KNaPP pH 7,4/ 0,1% Triton/ 0,1% Albumin ausgespült und diese ebenfalls aufgetragen. Die Elution erfolgte bei 4°C mit 0,1 M KNaPP pH 7,4/ 0,1% Triton/ 0,1% Albumin bei einer Elutionsgeschwindigkeit von ca. 15 ml/Std. Die am Fraktionssammler aufgefangenen Fraktionen (0,9 ml) des ^{125}J-Insulin-Peaks wurden nach Zugabe von 10 mg Albumin pro

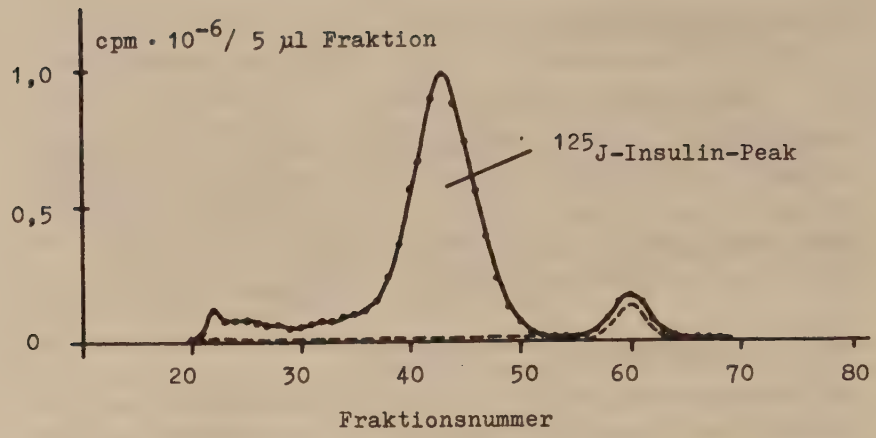


Abb. 1 Trennung von ^{125}J-Insulin und $^{125}J^-$ über Sephadex G 50 fine. Durchführung: vgl. Text. 5 µl jeder Fraktion wurden im Gammazähler gezählt und anschließend TCA-gefällt. ——— : Gesamtradioaktivität, – – – – –: TCA-lösliche Radioaktivität.

Fraktion bei -30°C aufbewahrt. Abb. 1 zeigt das Elutionsdiagramm einer typischen Insulin-Jodierung. Der ^{125}J-Einbau, d.h. der Anteil des eingesetzten $^{125}J^-$, der in Protein eingebaut wurde, betrug 80 - 90%. Die spezifische Aktivität des ^{125}J-Insulins lag bei 210 - 250 µCi/µg, entsprechend einem Gehalt von durchschnittlich 0,9 Atomen ^{125}J pro Insulinmolekül. Weniger als 1% der Radioaktivität in den Fraktionen des ^{125}J-Insulin-Peaks war löslich in 5% TCA.

Das so hergestellte ^{125}J-Insulin erleidet aufgrund von Autoradiolyseprozessen trotz der Anwesenheit von Albumin während der Lagerung einen laufenden Qualitätsverlust, der mittels TCA-Fällung verfolgt werden kann: nach 1 Woche beträgt die TCA-Löslichkeit der ^{125}J-Insulin-Fraktionen schon ca. 3,5%, nach 2 Wochen ca. 6% und nach 5 Wochen ca. 10%. Da die TCA-Fällung die Intaktheit des ^{125}J-Insulins erheblich überschätzt, nimmt seine Bindungsfähigkeit in dieser Zeit noch wesentlich stärker ab. Um Fehlinterpretationen von Meßergebnissen, besonders bei längerdauernden Versuchsreihen, zu vermeiden,

wurde eine ^{125}J-Insulin-Präparation daher möglichst nie länger als einen Monat verwendet und bei allen Versuchen zur Kontrolle stets die TCA-Löslichkeit des eingesetzten ^{125}J-Insulins überprüft.

4.2.2. Optimierung des ^{125}J-Einbaues

Um den Einfluß der verschiedenen Reaktionsparameter auf die Höhe des ^{125}J-Einbaues in Insulin zu untersuchen, wurde das Jodierungsverfahren wie folgt geändert: statt 1 mCi Na^{125}J wurde die entsprechende Menge NaJ (10^{-7} g) plus einer Tracermenge $^{125}J^-$ eingesetzt. Die Jodierungsreaktion wurde dann in der gleichen Weise wie in 4.2.1. unter Variation des jeweiligen Reaktionsparameters durchgeführt. Der ^{125}J-Einbau wurde nach Reaktionsende durch direkte TCA-Fällung der 170 µl Reaktionsgemisch als Quotient aus TCA-fällbarer und eingesetzter Gesamtradioaktivität bestimmt.

Abb. 2 zeigt die Abhängigkeit des ^{125}J-Einbaues von der Reaktionszeit, den Mengen der Reaktionsteilnehmer ($J^-/^{125}J^-$, Insulin, Chloramin T) und dem pH des Reaktionspuffers. Man sieht, daß die in der Jodierungsvorschrift von 4.2.1. angegebenen Zahlenwerte das beste Ergebnis liefern (vgl. Pfeile). Die Untersuchung des Einflusses der Reaktionstemperatur ergab, daß mit sinkender Temperatur auch der ^{125}J-Einbau sinkt, die Reaktion wird daher bei Raumtemperatur (23°C) durchgeführt. Die Molarität des Reaktionspuffers (geprüft wurde 0,1 - 0,25 M KNaPP pH 7,4) hatte keinen signifikanten Einfluß auf den Reaktionserfolg.

4.3. PRÄPARATION VON LEBERMEMBRANEXTRAKT
((84), modifiziert nach (20,21))

Die verwendeten Ratten (Stamm: Sprague-Dawley, Süddeutsche Versuchstierfarm, Tuttlingen) waren männlich oder weiblich, ca. 130 g schwer und hatten 12 - 15 Std. gehungert. Nach Dekapitation der Ratten wurden die Lebern entnommen und sofort in Eis gelegt. Alle Schritte der Präparation erfolgten bei 0 - 4°C. 70 - 80 g Rattenlebern wurden mit kaltem H_2O abgespült, mit der Schere zerkleinert und nach Zugabe von 480 ml Sucro-

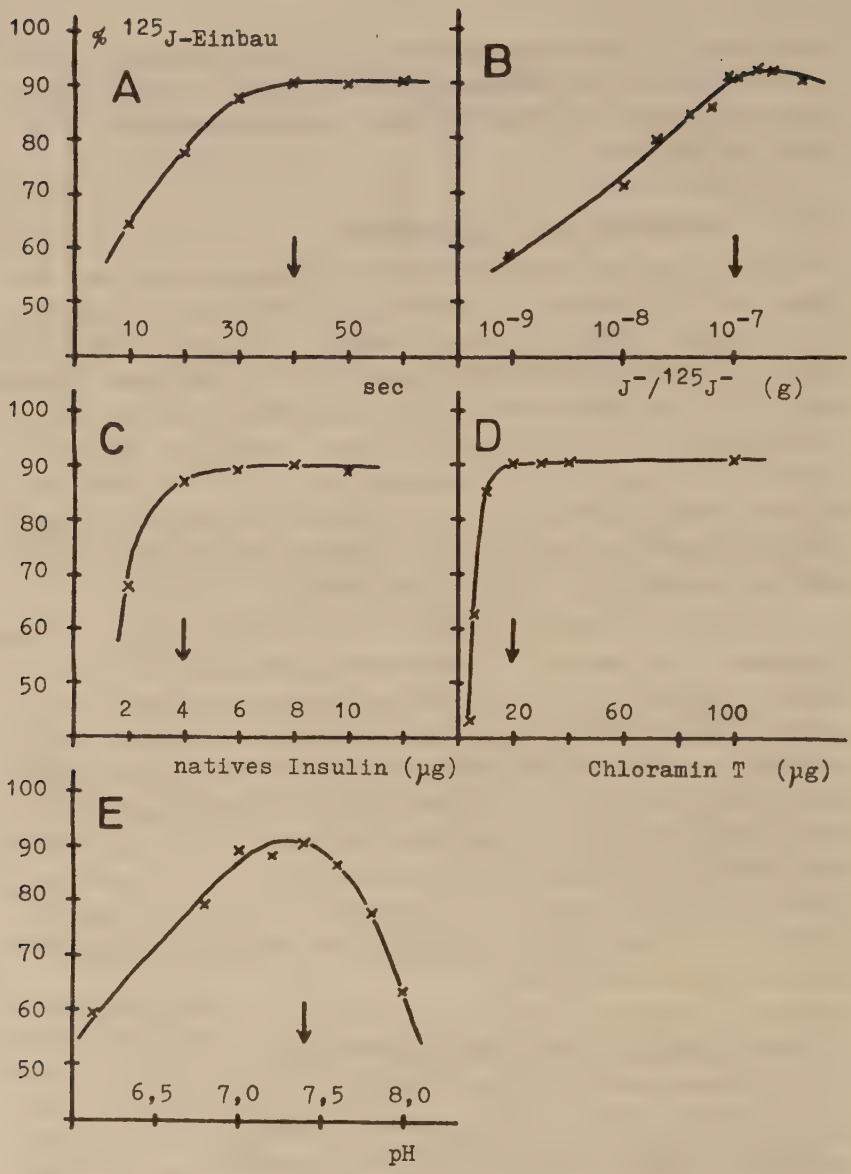


Abb. 2 Abhängigkeit des ^{125}J-Einbaues in Insulin von der Reaktionsdauer (A), der zur Reaktion eingesetzten $J^-/^{125}J^-$-Menge (B), der eingesetzten Insulin-Menge (C), der eingesetzten Chloramin T-Menge (D) sowie vom pH-Wert des Reaktionspuffers (E). Durchführung: vgl. Text. Die Pfeile entsprechen den in der Jodierungsvorschrift (4.2.1.) angegebenen Zahlenwerten.

se-Lösung (0,25 M Sucrose in 0,01 M KNaPP pH 7,4) in einem 60 ml-Potter S Glas-Teflon-Homogenisator (Fa. Braun, Melsungen) homogenisiert (10 mal bei 100 rpm auf und ab). Das Homogenat wurde 10 min. bei 600 × g zentrifugiert (Beckman-Kühlzentrifuge, JA 14-Rotor, 2.400 rpm), abdekantiert und der Überstand 30 min. bei 12.000 × g zentrifugiert (Beckman-Kühlzentrifuge, JA 14-Rotor, 11.000 rpm). Der Überstand wurde wiederum vorsichtig abdekantiert und 35 min. bei 97.000 × g zentrifugiert (Beckman-Ultrazentrifuge, Ti 45-Rotor, 35.000 rpm). Es wurde abdekantiert, das Pellet in ca. 120 ml 0,1 M KNaPP pH 7,4 mit einem Dounce-Homogenisator mit Kolben (L) (Fa. Braun, Melsungen) suspendiert und 30 min. bei 30.000 rpm wie zuletzt zentrifugiert. Dieser Waschschritt wurde noch zweimal wiederholt und das Pellet abschließend in 20 ml 0,1 M KNaPP pH 7,4 suspendiert. Die Lebermembranen wurden entweder in kleinen Portionen eingefroren oder direkt zur Triton-Extraktion weiterverwendet. Die Ausbeute betrug 400 - 500 mg Membranprotein.

Zur Extraktion des Insulinrezeptors wurde die Membransuspension (20 - 25 mg Protein/ml) mit Triton X-100 (Endkonzentration 1,5% (v/v)) versetzt und 50 min. bei 23°C gerührt. Die Suspension wurde durch Zugabe von eiskaltem 0,1 M KNaPP pH 7,4 auf eine Tritonkonzentration von 0,5% verdünnt und bei 4°C 45 min. mit 35.000 rpm in der Beckman-Ultrazentrifuge wie oben zentrifugiert. Der gelblich opaleszierende Membranextrakt wurde abdekantiert und in kleinen Portionen bei -30°C aufbewahrt. Der Extrakt hatte einen Proteingehalt von 4 - 6 mg/ml. 50 - 60% des Membranproteins wurden extrahiert.

Für Bindungsstudien wurde der Extrakt in der Regel mit 0,1 M KNaPP pH 7,4 auf einen Tritongehalt von 0,1% weiterverdünnt. Die Anreicherung des Insulinrezeptors bis zur Stufe der Lebermembranen war ca. 25-fach, bis zum Extrakt ca. 45-fach. Die Haltbarkeit von Membranen und Extrakt bei -30°C war unterschiedlich: während beim Extrakt die Insulin-Abbauaktivität mit der Lagerungsdauer erheblich abnahm, die Insulin-Bindungsaktivität jedoch erhalten blieb, ließ bei Membranen die Bindungsaktivität nach und die Abbauaktivität blieb unverändert.

4.4. ^{125}J-INSULIN-BINDUNGSTEST

4.4.1. Durchführung und Auswertung des Bindungstests ((84), modifiziert nach (21))

^{125}J-Insulin (ca. 75.000 cpm = $3 \cdot 10^{-16}$ Mol) und der gelöste Rezeptor wurden in einem Gesamtvolumen von 250 - 300 µl inkubiert. Bis auf einige Versuche in 5.7.2. wurden alle Bindungstests grundsätzlich bei 4°C durchgeführt. Dabei betrug die Inkubationsdauer 20 - 70 Std., bei Verdrängungs- und Scatchard-Studien zur vollständigen Gleichgewichtseinstellung stets über 40 Std. Der Inkubationspuffer und -pH-Wert sowie sonstige Zusätze zum Inkubationsansatz werden jeweils angegeben, wobei die angegebenen Werte Endwerte im Inkubationsansatz bedeuten. Alle Inkubationen enthielten 0,05 - 0,1% (v/v) Triton X-100, um den Rezeptor in Lösung zu halten (zur Vermeidung der Adsorption von Insulin an die Gefäßwände (84) wurde Triton ad 0,03% auch allen insulinhaltigen Lösungen zugesetzt). Für Verdrängungs- und Scatchard-Studien enthielten die Inkubationsansätze außerdem natives Insulin in Konzentrationen von 0 - 30.000 ng/ml. Nach Ende der Inkubation wurde der Insulin-Rezeptor-Komplex bei 4°C durch Zugabe von 200 µl 0,4% γ-Globulin in 0,1 M KNaPP pH 7,4 und 500 µl 20% PEG in H_2O gefällt. Es wurde kräftig gerührt (Vortex), die Fällung 15 min. bei 4°C stehengelassen und anschließend bei 4°C 15 min. mit 6.000 x g zentrifugiert (Minifuge 2, Tragringrotor, 6.000 rpm). Der Überstand wurde abdekantiert, das Pellet zweimal durch Auffüllen und Abdekantieren mit kalter 10% iger PEG-Lösung gewaschen und im Gammazähler gezählt. Statt mit PEG-Lösung kann auch mit H_2O gewaschen werden.

Die spezifische Bindung wurde durch Subtraktion der unspezifischen Bindung in Anwesenheit von nativem Insulin (30 µg/ml) von der Gesamtbindung bestimmt. Bindungsangaben erfolgen in cpm (gebunden) oder in % Bindung = cpm (gebunden) / cpm (gesamt). Zur Auswertung der Bindungsstudien dienen halblogarithmische Verdrängungskurven und Scatchard-Diagramme (125). Als Bindungskonstanten werden verwendet: K_{50} = Konzentration an nativem Insulin, bei der halbmaximale Verdrängung des ge-

bundenen ^{125}J-Insulins vom Rezeptor stattfindet (für Verdrängungsstudien) sowie K_D = Dissoziationskonstante und BK = Bindungskapazität (für Scatchard-Analysen). Die Auswertung nichtlinearer Scatchard-Diagramme erfolgt wie jeweils angegeben.

4.4.2. Einstellung von pH und Ionenstärke im Bindungstest

Das Problem, in der Inkubationslösung eine bestimmte Pufferkonzentration und einen bestimmten pH-Wert einzustellen, die sich von den Werten unterscheiden, unter denen der gelöste Rezeptor vorliegt, stellt sich im Verlauf der Arbeit häufig. Die prinzipielle Vorgehensweise wird an zwei Beispielen erläutert:
Das gewünschte Inkubationsvolumen sei 300 µl, der gewünschte Endpuffer im Inkubationsansatz 0,05 M KNaPP pH 7,8, der Rezeptor liege in 0,01 M KNaPP pH 7,4 vor.

1. Variante:
100 µl ^{125}J-Insulin (75.000 cpm, in 0,13 M KNaPP pH 7,88/ 0,03% Triton)
+ 200 µl gelöster Rezeptor in 0,01 M KNaPP pH 7,4/ 0,1% Triton

2. Variante:
50 µl ^{125}J-Insulin (75.000 cpm, in 0,01 M KNaPP pH 7,4/ 0,03% Triton)
+ 50 µl 0,25 M KNaPP pH 7,91
+ 200 µl gelöster Rezeptor in 0,01 M KNaPP pH 7,4/ 0,1% Triton

Die Puffereinstellung wird also über die ^{125}J-Insulin-Lösung oder über eine separate Pufferlösung vorgenommen, wobei deren Molaritäten und pH-Werte so bemessen sind, daß die gewünschten Endwerte resultieren. Durch Simulation des Inkubationsansatzes mit grösseren Volumina und pH-Messung desselben wird der Erfolg kontrolliert. Man gibt z.B. im ersten Fall 2 ml 0,13 M KNaPP pH 7,88 und 4 ml 0,01 M KNaPP pH 7,4 zusammen und mißt den pH: dieser soll dann 7,8 betragen, sonst muß der pH der ^{125}J-Insulin-Lösung anders gewählt werden. Analog lassen sich alle in dieser Arbeit vorkommenden Molaritäten und pH-Werte im Inkubationsansatz erreichen. Simulation und Inkubation

müssen stets bei derselben Temperatur vorgenommen werden.

4.5. BESTIMMUNG DES INSULINABBAUES (84)

Wenn nicht anders angegeben, wurde die auf Abbau zu testende Probe mit ^{125}J-Insulin (ca. 75.000 cpm) in einem Gesamtvolumen bis zu 300 µl ca. 24 Std. bei 4°C in 0,01 - 0,1 M KNaPP pH 7,4 inkubiert. Nach Inkubationsende wurden bei 4°C 1 ml 1% Albumin in H_2O und 1 ml 10% TCA in H_2O zugegeben, kräftig gerührt (Vortex) und 10 min. stehengelassen. Anschließend wurde die Fällung bei 4°C 10 min. mit 6.000 x g zentrifugiert (Minifuge 2, Tragringrotor, 6.000 rpm). Der Überstand wurde abdekantiert und im Gammazähler gezählt. Die Angabe des Insulinabbaues erfolgt in cpm (TCA-löslich) oder in % Abbau cpm (TCA-löslich) / cpm (gesamt). Alle Abbau-Angaben wurden entsprechend der TCA-Löslichkeit des eingesetzten ^{125}J-Insulins korrigiert.

4.6. PROTEINBESTIMMUNG

Die Proteinbestimmungen erfolgten nach Lowry et al. (98), in der Durchführung wurde nach (123) verfahren.

Folin-Gebrauchs-Lösung:

1 ml 1% $CuSO_4 \cdot 5\ H_2O$ in H_2O
+ 1 ml 2% Kalium-Natrium-Tartrat in H_2O
+ 98 ml 2% $NaCO_3$ in H_2O

Phenolreagens:

Das Phenolreagens nach Folin-Ciocalteau (Fa. Merck, Darmstadt) wurde auf 1 N eingestellt (Titration mit 0,1 N NaOH gegen Phenolphtalein).

200 µl Probe wurden bei Raumtemperatur mit 4 ml Folin-Gebrauchs-Lösung versetzt und gerührt (Vortex). Nach 10 min. wurden 400 µl Phenolreagens zugegeben, gerührt und nach 30 - 40 min. die Extinktion bei 578 nm (E_{578}) gemessen. Als Standard diente 0,1% Albumin. Angaben der Proteinkonzentration erfolgen als E_{578} oder in mg Protein/ml.

Triton bildet oberhalb 0,1% mit dem Phenolreagens einen flok-

kigen gelben Niederschlag und stört so den Test. In diesen Fällen wurde die Probe erst nach Absitzen oder Abzentrifugieren dieses Niederschlags gemessen.

4.7. GELFILTRATIONEN

4.7.1. Reinigung des Rezeptors mittels Gelfiltration

Zur Reinigung des gelösten Rezeptors mittels Gelfiltration wurde eine 2,7 x 120 cm-Säule mit Sepharose 4B CL als Trenngel verwendet (gelegentlich auch eine 2,7 x 110 cm- oder 2 x 200 cm-Säule). Bei der Gelfiltration von Membranextrakt wurden maximal 5 ml 0,5% Extrakt (entsprechend 20 - 30 mg Extraktprotein) aufgetragen. Eluiert wurde mit 0,01 M KNaPP pH 7,4/ 0,1% Triton. Die Elutionsgeschwindigkeit betrug 15 - 20 ml/Std. Das Eluat wurde am Fraktionssammler mit UV-Durchflußphotometer (274 nm) aufgefangen, das Fraktionsvolumen betrug 7 - 8,5 ml.

4.7.2. Molekulargewichtsbestimmung mittels Gelfiltration

Zur Molekulargewichtsbestimmung wurde eine 2,7 x 120 cm-Säule mit Sepharose 4B CL und eine 2,7 x 125 cm-Säule mit Sepharose 6B CL als Trenngel verwendet. Die Elution erfolgte mit 0,05 M KNaPP pH 7,4/ 0,1 M NaCl/ 0,1% Triton/ 0,02% Na-Azid bei einer Elutionsgeschwindigkeit von 15 - 20 ml/Std. Das Eluat wurde in Fraktionen von 7 - 8,5 ml am Fraktionssammler mit UV-Durchflußphotometer (274 nm) aufgefangen. Ausschlußvolumen und Gesamtvolumen der Säulen wurden mit Dextranblau und DTE ermittelt. Als Standardproteine dienten (Molekulargewichte und Stokes'Radien in Klammern): Thyroglobulin (669.000, 85 Å), Ferritin (440.000, 61 Å), Katalase (232.000, 52,2 Å), Aldolase (158.000, 48,1 Å), Albumin (68.000, 35,5 Å), Ovalbumin (43.000, 30,5 Å) und Chymotrypsinogen (25.000, 20,9 Å). Die Elutionsvolumina aller Standardsubstanzen wurden mit Hilfe des UV-Durchflußphotometers bestimmt. Die Auswertung erfolgte durch Auftragung von K_{av} gegen den Logarithmus des Molekulargewichts und von $\sqrt{-\log (K_{av})}$ gegen den Stokes'

Radius, wobei $K_{av} = (V_e - V_o) / (V_t - V_o)$ ist mit V_e = Elutionsvolumen der Standardproteine oder des gesuchten Proteins, V_o = Ausschlußvolumen und V_t = Gesamtvolumen der Säule.

4.7.3. Gelfiltration des photoaffinitätsmarkierten Rezeptors

Hierfür wurde eine 1,4 × 120 cm-Säule mit Sepharose 6B CL als Trenngel verwendet. Als Elutionspuffer diente 0,05 M KNaPP pH 7,4/ 0,1 M NaCl/ 0,1% Triton/ 0,02% Na-Azid. Die Elutionsgeschwindigkeit betrug 4 - 5 ml/Std., das Fraktionsvolumen war 1,4 ml.

4.8. CON A-SEPHAROSE-BEHANDLUNG VON MEMBRANEXTRAKT

Vor ihrer Verwendung wurde die Con A-Sepharose bei 4°C nacheinander mit den folgenden Puffern jeweils 3 × 10 min. behandelt, wobei die Puffer nach jedem Schritt über eine Glasfritte abgesaugt wurden:

1) 0,1 M Acetatpuffer pH 4,4/ 1 M NaCl/ 0,1% Triton
2) Waschen mit H_2O
3) 0,1 M Tris-HCl-Puffer pH 9,0/ 1M NaCl/ 0,1% Triton
4) Waschen mit H_2O
5) 0,1 M Tris-HCl-Puffer pH 7,4/ 0,1% Triton/ 3 mM $CaCl_2$/ 3 mM $MnCl_2$
6) 0,1 M Tris-HCl-Puffer pH 7,4/ 0,1% Triton
7) 0,1 M KNaPP pH 7,4/ 0,1% Triton

Die so aktivierte Con A-Sepharose wurde entweder als Säulenmaterial (vgl. Abb. 11) oder im Batch-Verfahren wie anschliessend beschrieben eingesetzt:

1 Volumen abgesessene Con A-Sepharose und 5 Volumina 0,1% Extrakt wurden 20 Std. bei 4°C mit einem gebogenen Glasstab gerührt. Da Con A-Sepharose nach Herstellerangabe ca. 8 mg Con A pro ml Sepharose enthält, entspricht dies einem Verhältnis von 1 - 1,5 mg Con A pro mg Extraktprotein. Die Suspension wurde anschließend bei 4°C 15 min. mit 1.500 × g zentrifugiert (Minifuge 2, Tragringrotor, 2.000 rpm) und der

Überstand abpipettiert. Er wird im folgenden als Con A-Sepharose-Überstand bezeichnet. Die abzentrifugierte Con A-Sepharose wurde mindestens 5 mal durch Resuspendieren und Zentrifugieren mit 0,1 M KNaPP pH 7,4/ 0,1% Triton bei 4°C gewaschen. Zur Elution des Insulinrezeptors wurde sie in 0,1 M KNaPP pH 7,4 aufgenommen (gleiches Volumen wie der eingesetzte Extrakt) und mit MeMan (Endkonzentration 0,3 M) versetzt. Es wurde 2 - 3 Std. bei Raumtemperatur gerührt und wie oben zentrifugiert. Der Überstand dieser Zentrifugation wird im folgenden als Con A-Sepharose-Eluat bezeichnet. Er wurde bei -30°C gelagert.

4.9. CON A-FÄLLUNG VON MEMBRANEXTRAKT (85)

Im folgenden wird das Standardverfahren der Con A-Fällung beschrieben. Für die Untersuchungen in 6.4.1. wurden die verschiedenen Parameter entsprechend variiert.

0,1% Membranextrakt wurde mit Con A (Endkonzentration 1 mg/ml) und Ca^{++} und Mn^{++} (Endkonzentration jeweils 0,3 mM) versetzt und 15 Std. bei 4°C gerührt. Das Präzipitat wurde bei 4°C 15 min. mit 10.000 x g abzentrifugiert (Servall-Tischzentrifuge, SS 34-Rotor, 10.000 rpm) und der Überstand abdekantiert. Er wird im folgenden als Con A-Überstand bezeichnet. Das Pellet wurde zweimal durch vorsichtiges Auffüllen und Abdekantieren im Zentrifugenglas mit 0,1 M KNaPP pH 7,4/ 0,1% Triton gewaschen. Zur Elution wurde es mit 0,1 M KNaPP pH 7,4/ 0,1% Triton/ 0,3 M MeMan versetzt (gleiches Volumen wie der eingesetzte Extrakt) und 1 - 2 Std. bei Raumtemperatur unter kräftigem Rühren mit einem Rührfisch aufgelöst. Die resultierende Lösung war meist optisch klar, anderenfalls wurde sie noch einmal wie oben zentrifugiert. Sie wird im folgenden als Con A-Eluat bezeichnet. Die Lagerung erfolgte bei -30°C.

4.10. PHOTOAFFINITÄTSMARKIERUNG DES INSULINREZEPTORS (Methode nach K.-N. Klotz, unveröffentlicht und (83), modifiziert nach (144,145))

Zur Photoaffinitätsmarkierung des Insulinrezeptors wurde

$N^{\varepsilon B29}$-Mono(4-Azidobenzoyl)-^{125}J-Insulin (^{125}J-MABI) verwendet. Der 4-Azidobenzoyl-Rest an der ε-Aminogruppe von Lys B29 spaltet bei Bestrahlung im längerwelligen UV N_2 ab und kann dann mit seiner molekularen Umgebung eine kovalente Bindung eingehen.

4.10.1. Präparation von ^{125}J-MABI

Die Präparation und Lagerung aller Produkte erfolgte im Dunkeln.
27 mg gereinigtes Insulin wurden in 2,2 ml Dimethylformamid und 10 µl Triäthylamin gelöst und 3,6 mg N-Hydroxysuccinimidester der 4-Azidobenzoesäure (synthetisiert nach (43)), in 400 µl Dimethylformamid gelöst zugegeben. Nach 5 Std. Rühren bei Raumtemperatur wurde mit 5 ml 1 N Essigsäure versetzt. Der pH-Wert wurde mit 1 N NH_3 auf etwa 5,4 eingestellt, wobei das Reaktionsprodukt ausfiel. Das Präzipitat wurde 3 Std. bei 2°C stehengelassen, abzentrifugiert und mit 2 ml eiskaltem Aceton gewaschen.

Die Reinigung des Rohproduktes erfolgte über Ionenaustauschchromatografie an SP-Sephadex C 25. Die SP-Sephadex-Säule (2 × 40 cm) wurde mit Startlösung (1,5 M Essigsäure/ 6 M Harnstoff/ 0,02 M NaCl) äquilibriert. Das Präzipitat wurde in Startlösung gelöst auf die Säule aufgetragen und mit einem Gradienten aus 400 ml Startlösung und 400 ml 1,5 M Essigsäure/ 6 M Harnstoff/ 0,4 M NaCl eluiert. Das Eluat wurde in Fraktionen von ca. 4 ml am Fraktionssammler mit UV-Durchflußphotometer (274 nm) aufgefangen (Abb. 3). Die Fraktionen des MABI-Peaks wurden vereinigt und bei 4°C erst gegen 0,02 M Na-Acetat, dann gegen H_2O dialysiert, wobei das Produkt ausfiel. Die Suspension wurde lyophilisiert, das Lyophilisat in 1 N Essigsäure* gelöst und über Gelfiltration an Sephadex G 50 fine (1,1 × 50 cm-Säule) gereinigt. Die Elution erfolgte mit 1 N Essigsäure*, das Eluat wurde in Fraktionen von 2 ml am

*Bei der analogen Präparation von ^{125}J-DABI (ausgehend vom DABI-Peak in Abb. 3) wurde hier 0,1 M Ammoniumacetat-Puffer pH 7,8 verwendet.

Fraktionssammler mit UV-Durchflußphotometer (274 nm) aufgefangen. Die Fraktionen des MABI-Peaks wurden vereinigt und lyophilisiert.

Die Jodierung von MABI erfolgte nach der gleichen Vorschrift wie die Insulin-Jodierung (4.2.1.), abweichend wurden jedoch 10 µg MABI (statt 4 µg Insulin) in die Reaktion eingesetzt. Nach der abschließenden Gelfiltration an Sephadex G 50 fine wurden die ^{125}J-MABI-Fraktionen ebenfalls mit Albumin versetzt und bei -30°C aufbewahrt. Das so präparierte ^{125}J-MABI hatte eine spezifische Aktivität von ca. 90 µCi/µg. Weniger als 1% der Radioaktivität der ^{125}J-MABI-Fraktionen war löslich in 5% TCA.

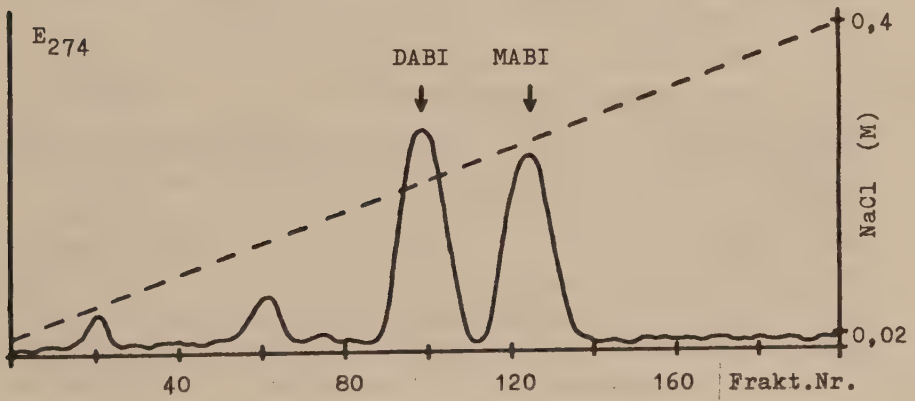


Abb. 3 Trennung von Mono(4-Azidobenzoyl)-Insulin (MABI) und Di(4-Azidobenzoyl)-Insulin (DABI) über SP-Sephadex C 25. Durchführung: vgl. Text. — — — — : NaCl-Gradient.

4.10.2. Durchführung der Photoaffinitätsmarkierung

^{125}J-MABI und gelöster Rezeptor wurden unter den jeweils angegebenen Bedingungen inkubiert. Nach Inkubationsende wurden die Ansätze 20 min. bei 4°C unter Rühren mit N_2 begast, wobei der Gasstrom zur Vermeidung von Blasenbildung nur auf die Oberfläche geleitet wurde. Dann wurden die Proben unter weiterem Rühren und Begasen 1 Std. mit einer UV-Lampe (Philips HPK 125 W) im Abstand von 13 cm bestrahlt. Die Proben standen

während der Photolyse in Eis in einem Glasgefäß, sodaß sie gekühlt blieben und kurzwellige UV-Anteile durch die zwischen UV-Lampe und Proben befindliche Glasgefäßwand absorbiert wurden. Nach Ende der Photolyse wurde noch weitere 20 min. bei 4°C unter Rühren mit N_2 begast und die Proben bis zu ihrer Untersuchung mittels Gelfiltration und Elektrophorese eingefroren. Zur Ermittlung des Photolyseerfolges wurden Aliquots aller Proben vor und nach der Photolyse entnommen und PEG-gefällt. Durch Dissoziation des reversibel gebundenen ^{125}J-MABI mit einem Überschuß an nativem Insulin (30 µg/ml, 15 min. bei 37°C) wurde der Anteil der spezifisch und kovalent am Rezeptor gebundenen Radioaktivität festgestellt. Je nach Inkubationsbedingungen wurden 3 - 7% spezifische kovalente Bindung erhalten.

4.11. SDS-PAGE

4.11.1. Durchführung der SDS-PAGEn

Zur Untersuchung des photoaffinitätsmarkierten Rezeptors wurden SDS-PAGEn mit diskontinuierlichem und kontinuierlichem Puffersystem an Rundgelen (Durchmesser 6 mm, Länge 110 mm) und Flachgelen (170 × 170 × 1,5 mm) durchgeführt. Alle Glasplatten und -röhrchen wurden vor Gebrauch mit Decon 90-Lösung (BDH) gereinigt. Als diskontinuierliches System wurde das folgende System nach Laemmli (91) verwendet: Trenngel: 7% Acrylamid/ 0,187% Bis, Trenngelpuffer: 0,375 M Tris-HCl pH 8,7/ 0,1% SDS. Sammelgel: 5% Acrylamid/ 0,133% Bis (in späteren Versuchen 4% Acrylamid/ 0,107% Bis), Sammelgelpuffer: 0,125 M Tris-HCl pH 6,8/ 0,1% SDS. Beide Gele enthielten zur Polymerisation 0,1% Ammoniumpersulfat und 0,06% TEMED. Das Trenngel wurde nach dem Gießen mit Trenngelpuffer überschichtet, 30 min. zur Polymerisation bei Raumtemperatur stehengelassen und die Oberfläche gut mit Trenngelpuffer gespült. Nach weiterem Stehenlassen über Nacht bei Raumtemperatur unter Trenngelpuffer wurde das Sammelgel aufgegossen (Höhe bei den Rundgelen 1 cm, bei den Flachgelen 1,5 cm). Nach dem Aufsetzen des Kammes (Taschenbreite 7 mm) wurde 30 min. zur Polymerisation bei Raumtemperatur stehengelassen, die Oberfläche gut mit Elektrodenpuffer (0,025 M Tris - 0,192 M Glycin pH 8,3/ 0,1% SDS) gespült und

mit Elektrodenpuffer aufgefüllt.

Als kontinuierliches Elektrophoresesystem diente das folgende System nach Fairbanks (38). Es wurde nur für Flachgele verwendet. Gelkonzentration: 4% Acrylamid/ 0,107% Bis, Gelpuffer (= Elektrodenpuffer): 0,4 M Tris/ 0,2 M Na-Acetat/ 0,02 M EDTA • Na_2/ 0,1% SDS, mit Essigsäure auf pH 7,4 eingestellt. Zur Polymerisation enthielt das Gel 0,1% Ammoniumpersulfat und 0,06% TEMED. Nach dem Aufsetzen des Kammes wurde 1 - 2 Std. bei Raumtemperatur zur Polymerisation stehengelassen, die Oberfläche gut mit Gelpuffer gespült und das Gel bei 4°C über Nacht unter Gelpuffer stehengelassen.

Die Proben hatten die folgende Zusammensetzung (Endkonzentration): Probenpuffer: 0,0625 M Tris-HCl pH 6,8 (war bei Laemmli- und Fairbanks-Gelen gleich), Proteingehalt: max. 7,5 - 10 mg/ml, SDS: 5%, Glycerin: 10%, Bromphenolblau: 0,002%, EDTA • Na_2: 0,5 mM, DTE (für reduzierte Proben): ca. 80 mM. Je nach verwendetem Rezeptorpräparat enthielten die Proben außerdem Triton bzw. KNaPP. Die Proben wurden, wenn nicht anders angegeben, 2 min. bei 100°C behandelt und durch Unterschichten des Elektrodenpuffers auf die Gele aufgetragen. Das maximal aufgegebene Probenvolumen betrug bei den Rundgelen 200 µl, bei den Flachgelen 50 µl pro Tasche, die maximale Proteinmenge war 120 µg pro Rundgel bzw. 30 µg pro Tasche (bei den Fairbanksgelen auch mehr).

Alle Elektrophoresen wurden bei Raumtemperatur ohne Kühlung durchgeführt. Die konstantgehaltene Stromstärke betrug bei den Rundgel-Elektrophoresen 4 mA pro Rundgel, bei den Flachgel-Elektrophoresen 36 mA (Laemmli-Gele) bzw. 46 mA (Fairbanks-Gele). Die Elektrophoresen wurden beendet, wenn sich die Bromphenolblau-Bande 1 cm (Laemmli-Gele) bzw. 5 cm (Fairbanks-Gele) vor dem Ende des Gels befand. Die Elektrophoresedauer betrug bei den Rundgelen 3,5 - 4 Std., bei den Flachgelen 4,5 Std. (Laemmli-Gele) bzw. 5,5 Std. (Fairbanks-Gele).

Die Rundgele wurden gefärbt oder mit dem Gelschneider in 1 mm-Scheiben geschnitten. Das Färben der Gele erfolgte mit 0,025% Coomassie Blue in 25% Isopropanol/ 10% Essigsäure über Nacht bei Raumtemperatur (38). Entfärbt wurde durch Diffusion

mit 10% Essigsäure/ 10% Methanol. Die Flachgele wurden direkt oder nach dem Anfärben getrocknet (3 Std. bei 80°C unter Wasserstrahlvakuum). Die Autoradiografie erfolgte mit KODAK X-OMAT-AR Film (20 × 25 cm) 3 - 30 Tage in Kassetten bei -30°C. Die Filme wurden entwickelt und fixiert mit Adefo Röntgen Rapid-Entwickler und Adefo Röntgen Rapid-Fixierer nach Vorschrift des Herstellers.

4.11.2. Molekulargewichtsbestimmung mittels SDS-PAGE

Die Molekulargewichtsbestimmung des photoaffinitätsmarkierten Rezeptors und seiner Untereinheiten wurde an Flachgelen nach Laemmli und Fairbanks durchgeführt. Es wurden folgende Standardproteine verwendet (in Klammern die Molekulargewichte der Hauptbanden der Proteine nach SDS/Mercaptoäthanol-Behandlung): Standard-Kit von Boehringer: RNA-Polymerase (39.000, 155.000 und 165.000, entsprechend der α-, β- und β'-Untereinheit), Albumin (68.000) und Trypsininhibitor (21.500); Standard-Kit von BDH: vernetzte Protein-Polymere (56.000 - 280.000, entsprechend dem Monomeren bis Pentameren); verschiedene Proteine: Thyroglobulin (330.000), Ferritin (220.000), Albumin (68.000), Katalase (60.000), Ovalbumin (43.000) und Aldolase (40.000). Die Probenbehandlung der Kits von Boehringer und BDH erfolgte nach Vorschrift der Hersteller. Die anderen Proteine bis auf Ferritin wurden im Probenpuffer mit 5% SDS und 5% Mercaptoäthanol 7 min. bei 100°C behandelt, Ferritin wurde mit 5% SDS und 1% Mercaptoäthanol 15 min. bei 60°C behandelt.

Nach der Elektrophorese wurden die Gele gefärbt, getrocknet und autoradiografiert und die R_F-Werte der Standardproteine und der Rezeptorbanden bestimmt. Dabei ist der R_F-Wert bei den Elektrophoresen nach Laemmli definiert als Quotient aus der Laufstrecke der Proteinbande und der Laufstrecke der Bromphenolblau-Bande. Bei den Elektrophoresen nach Fairbanks wird R_F wegen der sehr breiten diffusen Bromphenolblau-Bande definiert als Quotient aus der Laufstrecke der Proteinbande und der Laufstrecke der Albuminbande. Die Auswertung der Molekulargewichtsbestimmung erfolgte durch Auftragen der R_F-Werte gegen den Logarithmus der Molekulargewichte.

5. ERGEBNISSE

5.1. INHIBITOREN DES INSULINABBAUES

Für alle in dieser Arbeit beschriebenen Versuche zur Reinigung und Charakterisierung des Insulinrezeptors wurde Tritonextrakt aus Rattenlebermembranen als Ausgangsmaterial eingesetzt. Dieser Membranextrakt besitzt selbst bei 4°C beträchtliche Insulin-Abbauaktivität. Bei längeren Inkubationszeiten, wie sie zur Einstellung des Bindungsgleichgewichts bei allen Bindungsstudien erforderlich sind, erhält man durch Abbau des ^{125}J-Insulins bzw. des nativen Insulins in der Inkubationslösung fehlerhafte Resultate: die spezifische Bindung fällt zu niedrig aus und Verdrängungskurven und Scatchard-Diagramme sind in ihrer Form verändert. Es lassen sich daher keine korrekten Bindungsdaten mehr aus ihnen ableiten.

Aus diesem Grund wurde eine Reihe verschiedener Substanzen getestet, von denen eine Hemmwirkung auf Insulin-Abbauaktivitäten z.T. aus der Literatur bekannt war (1,9,40,42,112). Neben der abbauinhibierenden Wirkung wurde untersucht, ob die jeweilige Substanz einen direkten Einfluß auf die Insulin-Rezeptor-Bindung bzw. auf die Intaktheit von ^{125}J-Insulin selbst hatte (Tabelle 1).

Als sehr gute Abbauinhibitoren erwiesen sich Trasylol, NEM, p-Chlormercuribenzoat, Bacitracin, 2,6-Dichlorphenol-Indophenol, Methylenblau, EDTA · Na_2, o-Phenanthrolin und $CuSO_4 \cdot 2\ H_2O$. Für die Anwendung in Bindungsstudien entfallen jedoch Methylenblau, EDTA · Na_2 und $CuSO_4 \cdot 2\ H_2O$, da sie die Bindung sehr stark stören. 2,6-Dichlorphenol-Indophenol führt umgekehrt zu einer Erhöhung der Insulin-Rezeptor-Bindung. Der Grund dafür ist noch unbekannt. Tabelle 1 zeigt außerdem, daß die SH-Verbindungen GSH, DTE und Mercaptoäthanol den Insulinabbau durch direkten reduzierenden Angriff am Insulinmolekül zusätzlich steigern.

Aus dem nur geringen oder nicht vorhandenen Einfluß von NEM, p-Chlormercuribenzoat und Phenylmethylsulfonylfluorid auf die Insulin-Rezeptor-Bindung läßt sich schließen, daß an der Bin-

Inhibitor	Konzentr. im Test	A [%Abbau]	B (Rez.-Bind.)	C (TCA-lösl.)
Ohne Inhibitor	-	15	0	0
NEM	0,1 mM	5	0	
	1,0	2	0	
	3,3	1	-	0
p-Chlormercuribenzoat	0,01 mM	4	0	
	0,03	0	-	
	0,1	0	--	0
Trasylol	330 U/ml	15		
	2220	5	0	
	3330	1	-	0
Bacitracin	0,3 mM	4	0	
	1,0	1	0	
	3,0	1	-	0
Albumin	0,1 %	15	0	
	1.0	4	-	0
2,6-Dichlorphenol-Indophenol	0,1 mM	10	0	
	1,0	5	+	
	3,3	2	+	0
Methylenblau	0,1 mM	9	-	
	1,0	4	--	
	3,3	1	--	0
Phenazin-Methosulfat	10,0 mM	4	--	0
$K_3\,[Fe(CN)_6]$	10,0 mM	6	-	++
EDTA · Na_2	10,0 mM	4	-	
	30,0	1	--	0
o-Phenanthrolin *	0,3 mM	0	0	
	1,0	0	0	
	3,0	0	0	0
NaCl	1,0 M	6	n.d.	0
$CuSO_4 \cdot 2\,H_2O$	0,05 mM	5	--	
	0,5	2	--	0
$ZnCl_2$	0,1 mM	16	-	0
$CaCl_2 \cdot 2\,H_2O$	0,14 mM	12	0	0
$MgSO_4 \cdot 7\,H_2O$	5,0 mM	11	0	0

* bei manchen Extrakten keine vollständige Inhibitorwirkung

Fortsetzung:

Triton X-100	0,05 % 0,1 1,0	13 13 9	0 - --	0
Harnstoff	0,2 M 2,0	16 5	0 --	+
Chloroquin-Diphosphat	6,0 mM 20,0	8 4	--	0
Phenylmethylsulfonylfluorid	3,0 mM	4	0	0
tert.Butyl-Hydroxyperoxid	20,0 mM	10	--	+
Jodacetamid	30,0 mM	9	-	+
Indol-3-Essigsäure	2,0 mM	5	n.d.	n.d.
Ophtalmsäure	3,0 mM	15	n.d.	n.d.
S-Methyl-GSH	3,0 mM	15	n.d.	n.d.
γ-Glu-Ala-Gly	3,0 mM	15	n.d.	n.d.
γ-Glu-Ser-Gly	3,0 mM	15	n.d.	n.d.
Glutathion oxidiert (GSSG)	30,0 mM	13	0	0
GSH	3,0 mM	24	n.d.	++
DTE	3,0 mM	34	n.d.	++
2-Mercaptoäthanol	3,0 mM	27	n.d.	++

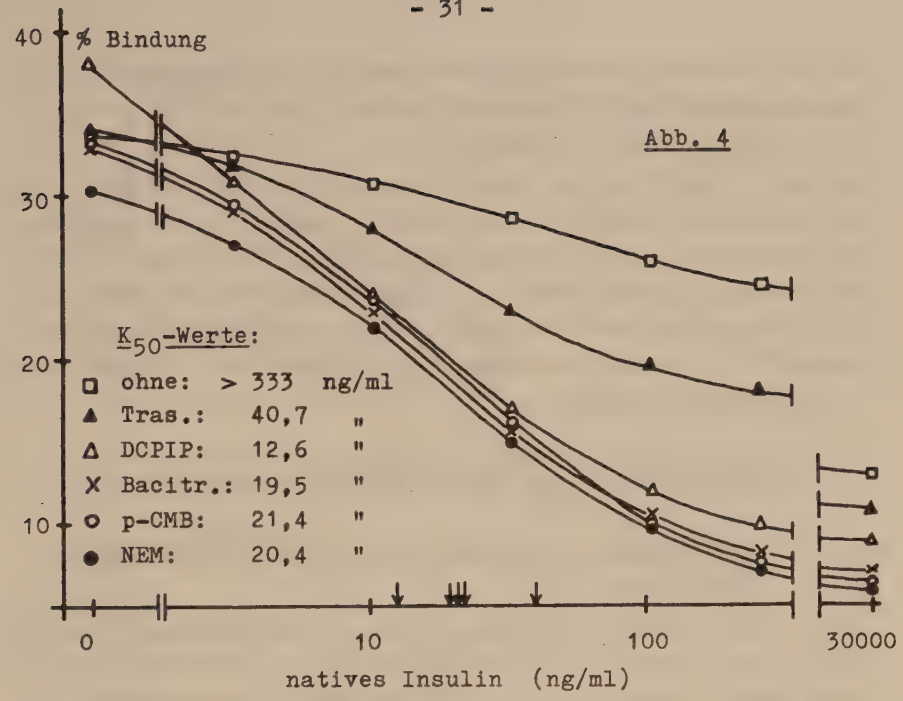
Tab. 1 Inhibitoren des Insulinabbaues. Die aufgeführten Substanzen wurden in den angegebenen Konzentrationen auf ihre abbauinhibierende Wirkung (A), ihren Einfluß auf die Insulin-Rezeptor-Bindung (B) und ihren Einfluß auf die TCA-Löslichkeit von 125J-Insulin (C) getestet, A: 125J-Insulin wurde mit 0,1% Extrakt 90 min. bei 23°C in Gegenwart des jeweiligen Inhibitors inkubiert und der Abbau bestimmt. B: 125J-Insulin wurde mit einem fast abbaufreien 0,1% Extrakt in 0,1 M KNaPP pH 7,4 in Gegenwart des jeweiligen Inhibitors inkubiert und die Bindung bestimmt. 0 / + / - / -- : die spezifische Bindung ist gegenüber dem Vergleichstest ohne Inhibitor unverändert / erhöht / erniedrigt / stark erniedrigt. C: 125J-Insulin wurde mit dem jeweiligen Inhibitor 90 min. bei 23°C inkubiert, TCA-gefällt und die Radioaktivität im TCA-Überstand gemessen. 0 / + / ++ : die TCA-lösliche Radioaktivität ist gegenüber dem Vergleichstest ohne Inhibitor unverändert / erhöht / stark erhöht. n.d. = nicht bestimmt.

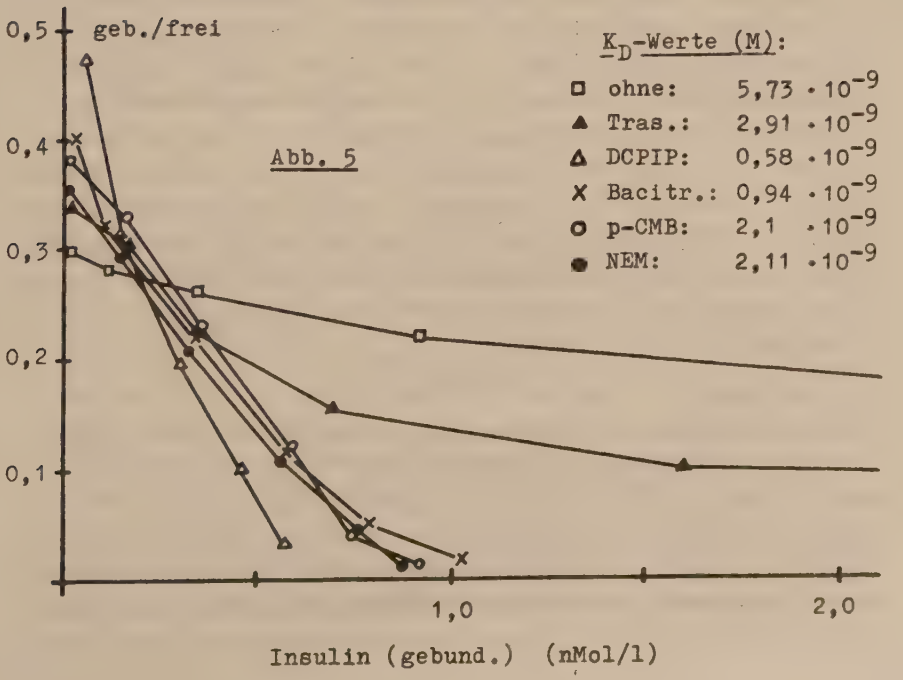
dung keine Cystein-, Serin-, Threonin- und Tyrosinreste maßgeblich beteiligt sind. Der Bindungsvorgang oder der Rezeptor selbst scheinen dagegen sehr oxidationsempfindlich zu sein, wie die Inhibierung der Bindung durch Methylenblau, Phenazin-Methosulfat, t-Butylhydroxyperoxid und $CuSO_4 \cdot 2\ H_2O$, merkwürdigerweise jedoch nicht durch 2,6-Dichlorphenol-Indophenol, zeigt.

Der Einfluß der Abbauinhibitoren auf die Form von Verdrängungskurven und Scatchard-Diagrammen läßt sich aus Abb. 4 und 5 ablesen. In Anwesenheit der Inhibitoren erhält man nach links verschobene steilere Verdrängungskurven mit wesentlich kleineren K_{50}-Werten. Ebenso ändert sich auch die Form der Scatchard-Diagramme völlig: die Anfangssteigung wird steiler, der flache hintere Kurvenabschnitt verschwindet fast völlig und die Schnittpunkte mit der Abszisse liegen weiter links. Bei der Auswertung der Diagramme resultieren daraus kleinere Dissoziationskonstanten und Bindungskapazitäten. Der Effekt läßt sich dadurch erklären, daß ohne Abbauinhibitoren die Konzentration an intaktem Insulin im Inkubationsansatz laufend abnimmt. Das Bindungsgleichgewicht, das sich jeweils einstellt, entspricht also Insulinkonzentrationen, die wesentlich kleiner als die eigentlich eingesetzten sind, woraus eine "Dehnung" der Scatchard- und Verdrängungskurven nach rechts resultiert.

Abb. 4 Verdrängungstests mit Membranextrakt in Gegenwart von Abbauinhibitoren. Die Verdrängungstests wurden mit 0,1% Extrakt in 0,1 M KNaPP pH 7,4 in Gegenwart von 3,3 mM NEM (●), 0,03 mM p-Chlormercuribenzoat (○), 1 mM Bacitracin (×), 2,2 mM 2,6-Dichlorphenol-Indophenol (△), 3.300 U/ml Trasylol (▲) und ohne Inhibitor (□) durchgeführt. Die Pfeile bezeichnen die K_{50}-Werte.

Abb. 5 Scatchard-Analyse der Verdrängungstests aus Abb. 4. Die angegebenen Dissoziationskonstanten wurden aus den Anfangssteigungen der Kurven berechnet.


40
% Bindung
30
20
10
Abb. 4
K_{50}-Werte:
ohne: > 333 ng/ml
Tras.: 40,7 "
DCPIP: 12,6 "
Bacitr.: 19,5 "
p-CMB: 21,4 "
NEM: 20,4 "
0
10
100
30000
natives Insulin (ng/ml)


0,5
geb./frei
0,4
0,3
0,2
0,1
Abb. 5
K_D-Werte (M):
ohne: $5{,}73 \cdot 10^{-9}$
Tras.: $2{,}91 \cdot 10^{-9}$
DCPIP: $0{,}58 \cdot 10^{-9}$
Bacitr.: $0{,}94 \cdot 10^{-9}$
p-CMB: $2{,}1 \cdot 10^{-9}$
NEM: $2{,}11 \cdot 10^{-9}$
1,0
2,0
Insulin (gebund.) (nMol/l)

Für das Verschwinden des flachen hinteren Kurvenabschnitts unter dem Einfluß der Abbauinhibitoren wird in 5.3.2. noch eine weitere Begründung gegeben.

Wie Abb. 4 und 5 zeigen, besitzt Trasylol, das nach Tabelle 1 ein sehr guter Inhibitor sein sollte, doch nur eingeschränkte Inhibitorwirkung. Ursache dieser Differenz könnte sein, daß bei Anwesenheit von Trasylol als Abbauprodukte nur große Insulinbruchstücke gebildet werden, die wegen ihrer TCA-Unlöslichkeit in der TCA-Fällung nicht von intaktem ^{125}J-Insulin zu unterscheiden sind.

5.2. GELFILTRATION VON MEMBRANEXTRAKT AN SEPHAROSE 4B CL

5.2.1. Auftrennung in Rezeptorpeak, Insulin-Abbaupeak und Proteinpeak

Die ersten Versuche zur Reinigung des Insulinrezeptors wurden mittels Gelfiltration von Membranextrakt an Sepharose 4B CL unternommen. Abb. 6 zeigt die Verteilung der Bindungsaktivität im Eluat eines solchen Säulenlaufs. Man erhält zwei spezifische Bindungspeaks. Die unspezifische Bindung zeigt lediglich einen kleinen Peak. Im Versuch von Abb. 7 wurde Membranextrakt mit ^{125}J-Insulin allein und in Gegenwart eines Überschusses an nativem Insulin vorinkubiert und die beiden Inkubationsansätze über dieselbe Sepharose 4B CL-Säule aufgetrennt. Man erkennt als Differenz der beiden Läufe einen spezifischen Peak in derselben Position wie der 1. Bindungspeak in Abb. 6. Der 2. Bindungspeak aus Abb. 6 ist in Abb. 7 wegen eines unspezifischen Peaks in derselben Position nicht eindeutig zu identifizieren.

Die Säulengröße in diesen Versuchen betrug 1,5 × 95 cm. Aus Kapazitätsgründen und wegen der besseren Auftrennung wurde sehr bald auf grössere Säulen (2,7 × 120 cm u.a.) übergegangen (vgl. 4.7.1.). Desgleichen wurde der Elutionspuffer von 0,1 M KNaPP pH 7,4/ 0,1% Triton (Abb. 6 und 7) in 0,01 M KNaPP pH 7,4/ 0,1% Triton geändert. Auf diese Weise können hohe, z.T. nicht mehr lösliche Phosphatkonzentrationen vermieden werden, die sonst nach Lyophilisation von Säulenlauf-

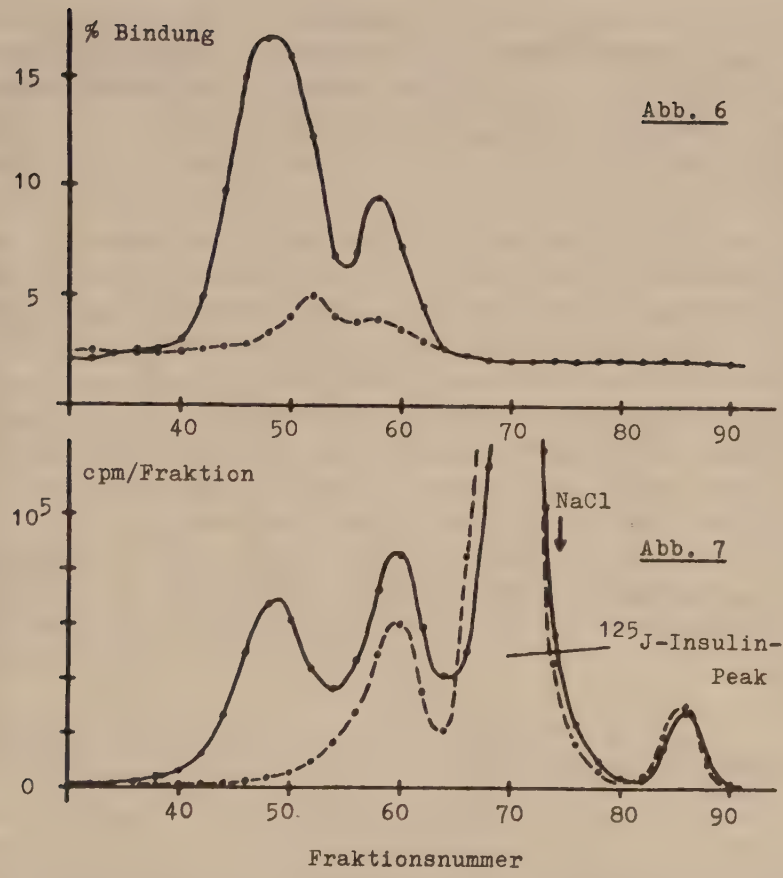


Abb. 6 Gelfiltration von Membranextrakt an Sepharose 4B CL. 1 ml 0,5% Extrakt wurde auf eine Säule (1,5 × 95 cm) aufgetragen, mit 0,1 M KNaPP pH 7,4/ 0,1% Triton eluiert (Elutionsgeschwindigkeit: 12 ml/Std., Fraktionsvolumen: 2,6 ml) und die Gesamtbindung (————) und die unspezifische Bindung (—·—·—·) im Eluat bestimmt. Puffer im Bindungstest: 0,1 M KNaPP pH 7,4.

Abb. 7 Gelfiltration von Membranextrakt an Sepharose 4B CL nach Vorinkubation mit 125J-Insulin. Jeweils 2 ml 0,1% Extrakt wurden mit 125J-Insulin (3 Mio. cpm) allein (————) und in Gegenwart von nativem Insulin (30 µg/ml) (—·—·—·) 25 Std. bei 4°C in 0,1 M KNaPP pH 7,4 inkubiert und an derselben Sepharose 4B CL-Säule unter denselben Bedingungen wie in Abb. 6 aufgetrennt. Die Fraktionen wurden im Gammazähler gezählt.

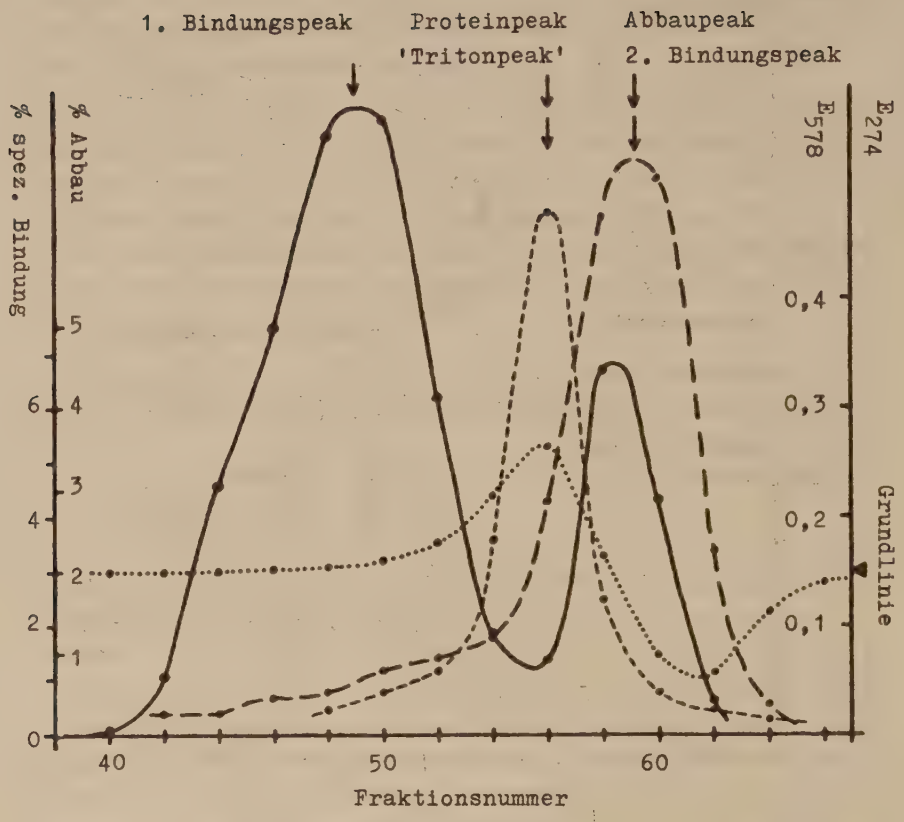


Abb. 8 Gelfiltration von Membranextrakt an Sepharose 4B CL. 5 ml 0,5% Extrakt wurden an einer Säule (2,7 × 110 cm) aufgetrennt und die spezifische Bindung (————), der Insulinabbau (— — —), die Proteinkonzentration als E_{578} (- - - - - -) und die Extinktion bei 274 nm (.....) im Eluat bestimmt. Puffer im Bindungstest: 0,04 M KNaPP pH 7,4.

Fraktionen und Lösen in kleinem Volumen, z.B. zur Rechromatografie, auftreten.

Abb. 8 zeigt eine typische Gelfiltration von Membranextrakt an einer Sepharose 4B CL-Säule der Größe 2,7 × 110 cm. Neben der spezifischen Bindung, die den gleichen Verlauf aufweist

wie in Abb. 6, wurden die Fraktionen hier auch auf Insulin-Abbauaktivität und auf ihren Proteingehalt getestet. Man sieht, daß die gesamte Insulin-Abbauaktivität und der Hauptteil des Extraktproteins sich vom 1. Bindungspeak abtrennen lassen, daß eine partielle Reinigung des Insulinrezeptors auf diesem Wege also möglich ist.

Die Extinktion bei 274 nm zeigt im Eluat aller Gelfiltrationen von Membranextrakt eine Welle in stets ähnlicher Position. Der Wellenberg fällt mit dem Proteinpeak zusammen und dürfte hauptsächlich durch einen erhöhten Gehalt dieser Fraktionen an Triton zustandekommen, das im UV stark absorbiert. Wahrscheinlich handelt es sich dabei um proteingebundenes Triton, das hier zusammen mit dem Hauptteil der Extraktproteine eluiert wird. Bei der Proteinbestimmung nach Lowry tritt bei den Fraktionen dieses Bereichs ein flockiger gelber Niederschlag auf, wie er für Tritonkonzentrationen über 0,1% bekannt ist. Der erhöhten Tritonkonzentration scheint im Wellental ein Bereich verminderter Tritonkonzentration zu folgen.

5.2.2. Untersuchung des Insulin-Abbaupeaks

Man erkennt in Abb. 8, daß der 2. Bindungspeak und die Insulin-Abbauaktivität an derselben Stelle eluiert werden. Verschiedene Versuche führen zu dem Schluß, daß dies nicht zufällig so ist, sondern daß beide Peaks zusammengehören. Allerdings wurde der 2. Bindungspeak nicht immer in so symmetrischer Form erhalten wie in Abb. 8, sondern besaß häufig eine Schulter oder sogar zwei Maxima. Das dürfte jedoch auf die Störung der Insulinbindung durch die Insulin-Abbauaktivität sowie die erhöhten bzw. erniedrigten Tritonkonzentrationen in den Fraktionen dieses Bereichs zurückzuführen sein.

Die These, daß zwischen 2. Bindungspeak und Abbaupeak eine Beziehung besteht, erfährt eine starke Unterstützung durch Versuche mit Inhibitoren und Aktivatoren des Insulinabbaues (Abb. 9). Die Abbildung zeigt das Elutionsdiagramm einer Gelfiltration von Extrakt, bei der die spezifische Bindung und

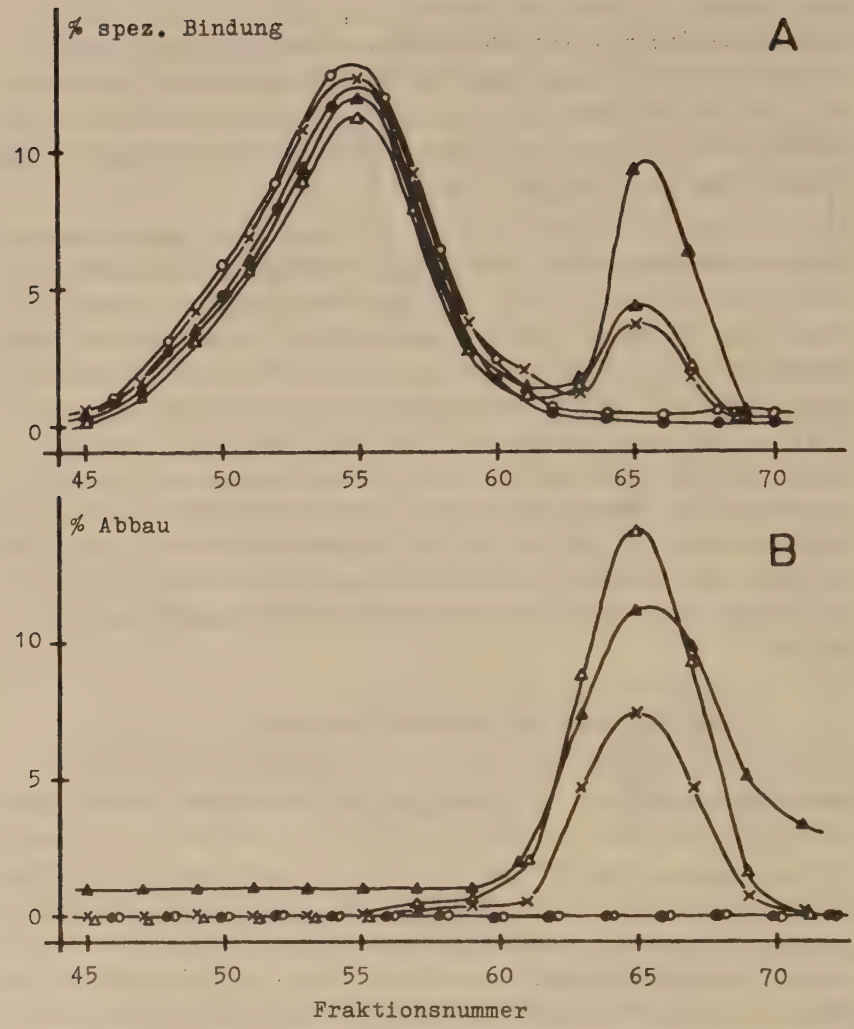


Abb. 9 Einfluß von Abbau-Inhibitoren und -Aktivatoren auf die spezifische Bindung und den Insulinabbau im Eluat einer Gelfiltration von Membranextrakt an Sepharose 4B CL. 5 ml 0,5% Extrakt wurden an einer Säule (2,7 × 120 cm) aufgetrennt. Die spezifische Bindung (A) und der Insulinabbau (B) im Eluat wurden in Anwesenheit von 2 mM NEM (●), 2 mM o-Phenanthrolin (○), 0,3 mM GSH (▲), 0,3 mM (je) Ca^{++}/Mn^{++} (△) und ohne Zusatz (×) bestimmt. Puffer im Bindungstest: 0,04 M KNaPP pH 7,4.

der Insulinabbau im Eluat in Anwesenheit der Inhibitoren NEM und o-Phenanthrolin bzw. der Aktivatoren GSH und Ca^{++}/Mn^{++} untersucht wurden. Während der 1. Bindungspeak nur wenig oder garnicht beeinfluß wird, ändert sich das Bindungsverhalten des 2. Bindungspeaks parallel zum Insulinabbau drastisch: NEM und o-Phenanthrolin inhibieren sowohl den Insulinabbau als auch die Bindung dieser Peaks völlig. GSH und Ca^{++}/Mn^{++} dagegen aktivieren den Insulinabbau und erhöhen die spezifische Bindung des 2. Bindungspeaks. Man erkennt jedoch, daß GSH trotz stärkerer Bindungsaktivierung den Abbau schwächer aktiviert als Ca^{++}/Mn^{++}, was der Parallelität von Bindung und Abbau scheinbar widerspricht. Eine Erklärung dafür wäre jedoch, daß die entstehenden Abbauprodukte nach GSH- bzw. Ca^{++}/Mn^{++}-Aktivierung unterschiedlich groß und damit unterschiedlich TCA-löslich sind.

Aufgrund dieser Ergebnisse wird die Hypothese aufgestellt, daß der 2. Bindungspeak und der Abbaupeak durch ein gemeinsames Molekül verursacht werden, das Insulin sowohl bindet als auch abbaut. Es wird angenommen, daß es sich dabei um ein insulinabbauendes Enzym handelt, wobei der 2. Bindungspeak die spezifische Substratbindung dieses Enzyms darstellt. Angesichts der unterschiedlichen Aktivierbarkeit von Bindung und Abbau durch GSH einerseits und Ca^{++}/Mn^{++} andererseits muß man in Erweiterung dieser Hypothese sogar die Existenz von zwei Abbauenzymen annehmen, die in (fast) gleicher Position von der Säule eluiert werden.

Insulin-Abbauenzyme, die durch GSH und Ionen stimulierbar sind und z.T. auch in Lebermembranextrakt gefunden wurden, werden von verschiedenen Autoren beschrieben (1,37,89,108,137,147). Zu diesem Themenkomplex wurden jedoch im Rahmen dieser Arbeit bis auf wenige Ausnahmen keine weiteren Untersuchungen mehr durchgeführt. Die Identität des oder der gefundenen Abbauenzyme ist somit noch unbekannt.

5.2.3. Untersuchung des Rezeptorpeaks

Bei der Untersuchung der Fraktionen aus dem 1. Bindungspeak mittels Verdrängungsstudien (nicht gezeigt) und Scatchard-

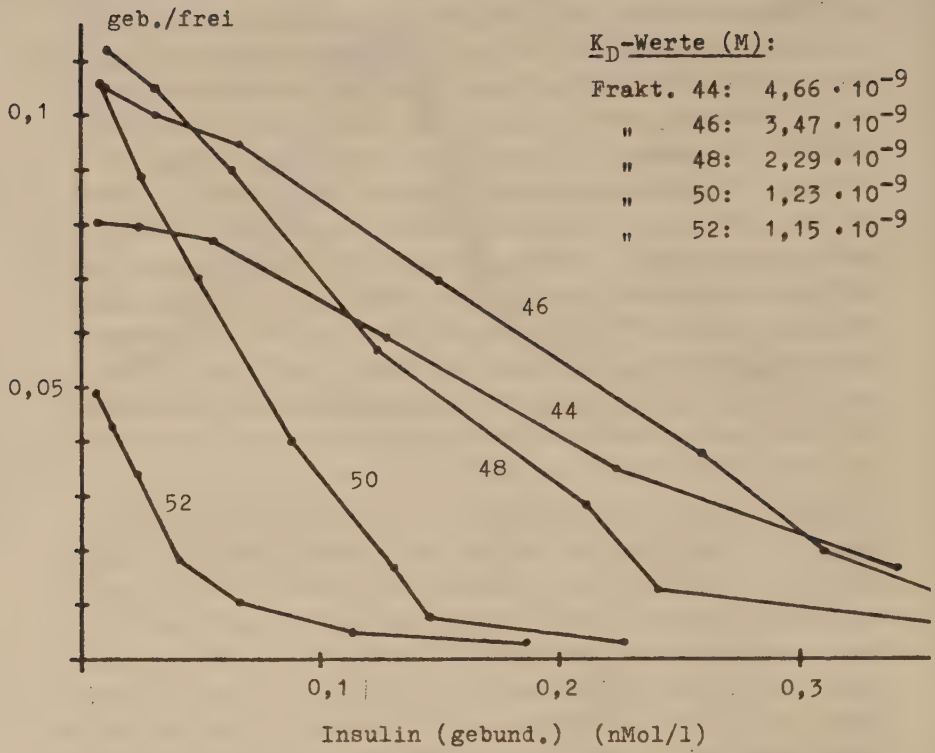


Abb. 10 Scatchard-Analyse der Insulinbindung von Fraktionen aus dem 1. Bindungspeak der Gelfiltration aus Abb. 8. Die Fraktionen 44, 46, 48, 50 und 52 (vgl. Abb. 8) wurden untersucht. Puffer im Bindungstest: 0,06 M KNaPP pH 7,4. Die angegebenen Dissoziationskonstanten wurden aus den Anfangssteigungen der Kurven berechnet.

Analysen (Abb. 10) ergab sich, daß der 1. Bindungspeak trotz seiner relativ symmetrischen Form nicht homogen ist: für die Fraktionen im aufsteigenden Ast des Peaks erhält man wesentlich grössere K_{50}-Werte und Dissoziationskonstanten als für die Fraktionen im absteigenden Ast. Dazu kommt, daß die Scatchard-Kurven der Fraktionen im Anfangsbereich des Peaks

nahezu linear sind, während sie für die nachfolgenden Fraktionen zunehmend nichtlinear werden. Die Inhomogenität des 1. Bindungspeaks soll an dieser Stelle lediglich festgestellt werden. Gründe für dieses Resultat ergeben sich in späteren Kapiteln.

5.3. CON A-SEPHAROSE-BEHANDLUNG VON MEMBRANEXTRAKT

5.3.1. Durchführung der Con A-Sepharose-Behandlung

Neben der Gelfiltration an Sepharose 4B CL wurde eine Teilreinigung des Insulinrezeptors auch über Affinitätschromatografie an Con A-Sepharose durchgeführt. Abb. 11 zeigt das Elutionsdiagramm eines Säulenlaufs von Membranextrakt über

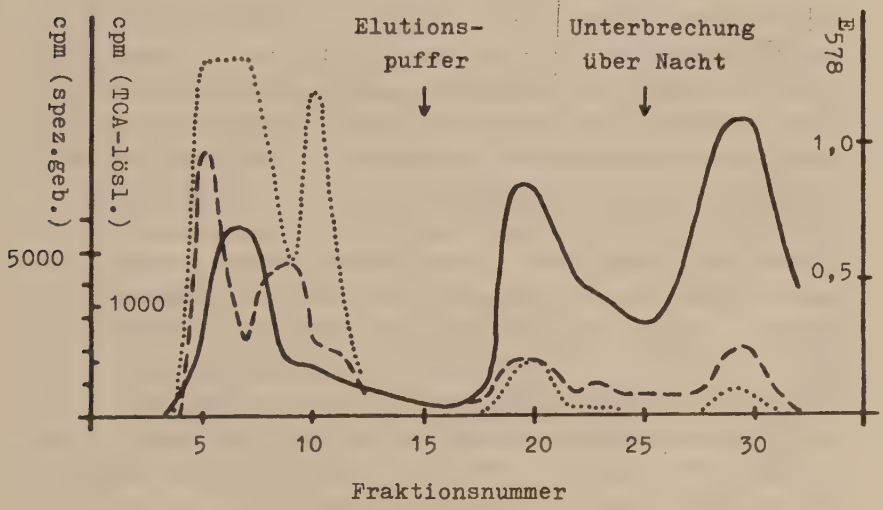


Abb. 11 Affinitätschromatografie von Membranextrakt an Con A-Sepharose. 12 ml 0,1% Extrakt wurden bei 4°C auf eine Con A-Sepharose-Säule (Volumen 10 ml) aufgetragen, mit 0,01 M KNaPP pH 7,4/ 0,1% Triton gewaschen und bei 4°C mit 0,01 M KNaPP pH 7,4/ 0,1% Triton/ 0,3 M MeMan eluiert (Elutionsgeschwindigkeit 9 ml/Std., Fraktionsvolumen 3 ml). Die Elution wurde zwischendurch für 15 Std. unterbrochen. ————: spezifische Bindung im Eluat (Puffer im Bindungstest: 0,05 M KNaPP pH 7,4), — — — —: Insulinabbau, ·····: Protein.

Con A-Sepharose. Der größte Teil des Proteins, insbesondere die Insulin-Abbauaktivität, wurde von Con A-Sepharose nicht gebunden. Die Bindungsaktivität wurde dagegen zu ca. 75 % auf der Säule festgehalten. Sie ließ sich mit 0,1 M MeMan im Elutionspuffer wieder eluieren, allerdings war die Elution erst nach längerem Stehenlassen der Säule mit Elutionspuffer relativ vollständig.

Prinzipiell gleiche Ergebnisse wurden bei der Behandlung von Membranextrakt mit Con A-Sepharose im Batch-Verfahren (vgl. 4.8.) erhalten, wobei die Elution des Rezeptors anfangs in gleicher Weise wie beim Säulenlauf mit 0,1 M MeMan im Elutionspuffer bei 4°C erfolgte. Auch hier enthielt das Con A-Sepharose-Eluat (vgl. Begriffsbestimmung in 4.8.) nur wenig Protein und fast keine Insulin-Abbauaktivität, dagegen bis zu 70% der Bindungsaktivität des Extrakts.

Das Hauptproblem bei den anfänglichen Versuchen lag in der nur langsamen und teilweise unvollständigen Elution des Rezeptors von der Con A-Sepharose mit 0,1 M MeMan bei 4°C. Unter Verwendung des Batch-Verfahrens wurden daher systematische Elutionsversuche unternommen. Als erstes zeigte sich, daß sich die Rezeptorausbeute im Con A-Sepharose-Eluat beträchtlich steigern ließ, wenn während der Elution gerührt oder geschüttelt wurde. Darüberhinaus wurde eine Reihe von Substanzen getestet, von denen sich annehmen ließ oder bekannt war, daß sie die Con A-Glykoprotein-Bindung inhibierten: verschiedene Zucker als Kompetitoren an der Con A-Bindungsstelle, saure und basische Puffer, um nichtoptimale pH-Bedingungen für die Con A-Bindung zu erreichen, EDTA • Na_2 und o-Phenanthrolin als Chelatoren der für die Con A-Bindung notwendigen Ionen (Ca^{++} und Mn^{++}), Triton, Harnstoff und KSCN zur Störung von hydrophoben, H-Brücken- und ionischen Wechselwirkungen und schließlich Boratpuffer zur Komplexierung von Kohlenhydratresten im Glykoprotein. Die Elutionswirkung aller dieser Substanzen wurde bei 4°C und 23°C getestet. Zur Kontrolle wurde der Einfluß dieser Substanzen auf die Insulin-Rezeptor-Bindung untersucht. Tabelle 2 faßt die Ergebnisse zusammen.

Elutionsmittel (KNaPP = 0,1 M KNaPP pH 7,4)	Einfluß auf die Bindung
0,1 M MeMan in KNaPP/ 0,1% Triton 0,2 M " 0,5 M "	0 0 (-)
0,1 M α-Methyl-D-Glucosid in KNaPP/ 0,2 M " 0,1% Triton 0,5 M "	0 0 (-)
0,1 M Mannose in KNaPP/ 0,1% Triton 0,2 M " 0,5 M "	0 0 (-)
0,1 M Glucose in KNaPP/ 0,1% Triton 0,2 M " 0,5 M "	0 0 (-)
0,1 M Sucrose in KNaPP/ 0,1% Triton 0,2 M " 0,5 M "	0 0 (-)
0,1 M Acetat-Puffer pH 4,0/ 0,1% Triton	-
0,1 M Tris-HCl-Puffer pH 9,0/ 0,1% Triton	+
3 mM EDTA $\cdot$ Na_2 in KNaPP/ 0,1% Triton	(-)
3 mM o-Phenanthrolin in KNaPP/ 0,1% Triton	0
0,3% Triton in KNaPP	-
2 M Harnstoff in KNaPP/ 0,1% Triton	-
0,3 M KSCN in KNaPP/ 0,1% Triton	-
0,1 M Borat-Puffer pH 6,5/ 0,1% Triton	(-)
0,3 M MeMan in KNaPP/ 0,1% Triton " " " "	0 0 0 0 0
KNaPP/ 0,1% Triton	0

Tab. 2 Elution des Insulinrezeptors von Con A-Sepharose. 0,1% Membranextrakt wurde mit Con A-Sepharose behandelt. Die Rezeptor-beladene Con A-Sepharose wurde zentrifugiert, gewaschen und unter den angegebenen Bedingungen eluiert. Anschließend wurde die spezifische Bindung im Con A-Sepharose-Eluat bestimmt

Elut.-Temp. [°C]	Elut.-Dauer [Std.]	Spez.Bind. im Eluat [cpm(geb.)]	Elut.-Temp. [°C]	Elut.-Dauer [Std.]	Spez.Bind. im Eluat [cpm(geb.)]
4	3	5550	23	1,5	9930
4	3	6250	23	1,5	10640
4	3	6880	23	1,5	10830
4	3	3100	23	1,5	6640
4	3	3990	23	1,5	8570
4	3	4650	23	1,5	9500
4	3	3060	23	1,5	5530
4	3	4120	23	1,5	7670
4	3	4740	23	1,5	8420
4	3	630	23	1,5	1000
4	3	1360	23	1,5	2280
4	3	2140	23	1,5	4680
4	3	600	23	1,5	700
4	3	1060	23	1,5	1910
4	3	1530	23	1,5	3710
4	0,5	0	23	0,3	0
4	0,5	0	23	0,3	630
4	3	150	23	1,5	190
4	3	110	23	1,5	60
4	3	30	23	1,5	0
4	0,5	90	23	0,3	310
4	0,5	160	23	0,3	60
4	3	90	23	1,5	420
4	0,5	1280	23	0,08	820
4	3	6310	23	0,3	5890
4	10	9310	23	0,7	8860
			23	1,5	10370
			23	3,5	10750
4	3	100	23	3,5	90

Fortsetzung Tab.2:
(Puffer im Bindungstest: 0,1 M KNaPP pH 7,4). Der Einfluß auf die Insulin-Rezeptor-Bindung wurde durch Bindungstests mit 0,1% Extrakt in Gegenwart der jeweiligen Substanz bestimmt. 0 / + / - : die spezifische Bindung ist gegenüber dem Vergleichstest ohne eine zugegebene Substanz unverändert/ erhöht/ erniedrigt.

Die beste Elutionswirkung hat 0,3 - 0,5 M MeMan (2 Std. bei 23°C oder >10 Std. bei 4°C), gefolgt von α-Methyl-D-Glucosid, Mannose, Glucose und Sucrose. Mit allen anderen Substanzen läßt sich keine Elution erreichen. Generell wird der Insulinrezeptor bei 23°C schneller von der Con A-Sepharose eluiert als bei 4°C. Die getesteten Zucker haben nur in hohen Konzentrationen (über 0,3 M) einen geringen Einfluß auf die Insulin-Rezeptor-Bindung.

5.3.2. Auswertung der Con A-Sepharose-Behandlung

Abb. 12 zeigt das Bindungsverhalten von Con A-Sepharose-Eluat im Vergleich zum Con A-Sepharose-Überstand und Membranextrakt. Der Bindungstest wurde jeweils mit und ohne NEM durchgeführt. Für den Membranextrakt und den Con A-Sepharose-Überstand erhält man ohne NEM nichtlineare Scatchard-Diagramme, deren Aussagekraft aber wegen der anwesenden Insulin-Abbauaktivität nur gering ist. Das Con A-Sepharose-Eluat zeigt dagegen ein fast lineares Scatchard-Diagramm mit einer Dissoziationskonstanten von $3{,}24 \cdot 10^{-9}$ M und einer Bindungskapazität von 6,8 pMol/mg Protein.

Die Zugabe von NEM führt sowohl beim Extrakt als auch beim Con A-Sepharose-Überstand, nicht jedoch beim Con A-Sepharose-Eluat, zu erheblich veränderten Scatchard-Diagrammen. Das läßt sich einerseits, wie schon in 5.1. erläutert, auf die Unterdrückung des Insulinabbaues zurückführen. Es kommt jedoch hinzu, daß NEM einen Bindungsanteil des Extrakts direkt inhibiert. Dies sieht man besonders deutlich am Scatchard-Diagramm des Con A-Sepharose-Überstandes, das in Anwesenheit von NEM keine Bindung mehr anzeigt.

Es liegt die Vermutung nahe, daß dieser Anteil der Bindungsaktivität des Extrakts (20 - 25%), der im Con A-Sepharose-Überstand enthalten ist, mit der Bindungsaktivität aus dem 2. Bindungspeak der Gelfiltration an Sepharose 4B CL (Abb. 8) identisch ist. In beiden Fällen tritt dieser Bindungsanteil gemeinsam mit der Insulin-Abbauaktivität auf und in beiden Fällen sind sowohl Bindungs- als auch Abbauaktivi-

A

K_D-Werte (M):

Eluat: $3{,}24 \cdot 10^{-9}$

Überst.: $1{,}82 \cdot 10^{-8}$

Extr.: $3{,}21 \cdot 10^{-9}$

BK (Eluat):

6,8 pMol/mg

B

K_D-Werte (M):

Eluat: $3{,}45 \cdot 10^{-9}$

Überst.: —

Extr.: $3{,}21 \cdot 10^{-9}$

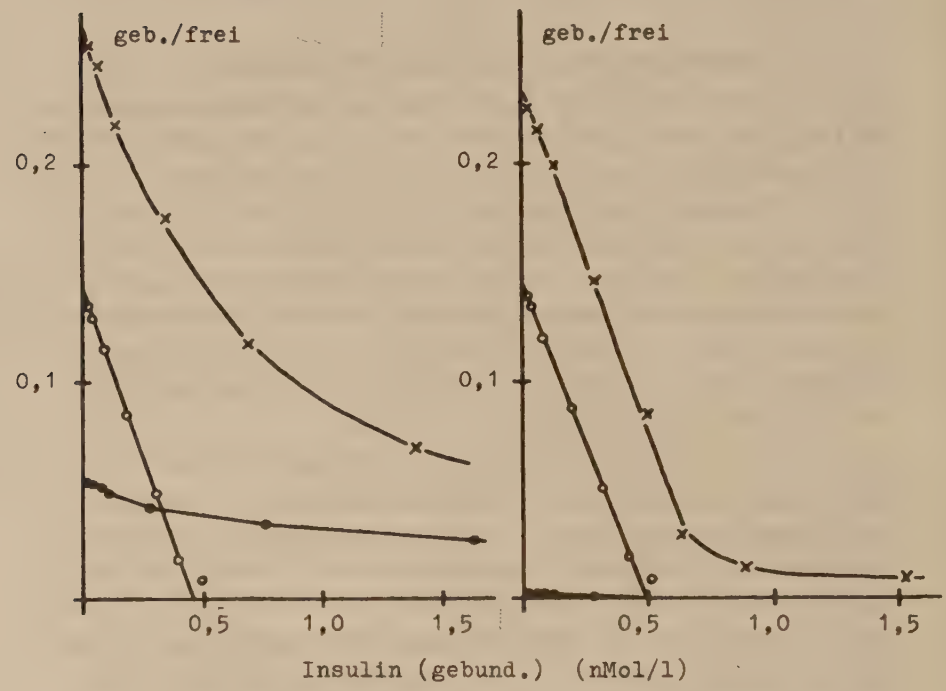


Abb. 12 Scatchard-Analyse der Insulinbindung von Con A-Sepharose-Eluat (o), Con A-Sepharose-Überstand (•) und Membranextrakt (×) aus einer Con A-Sepharose-Behandlung von 0,1% Membranextrakt (0,9 mg/ml). A: Bindungstest ohne Abbauinhibitor. B. Bindungstest in Gegenwart von 2 mM NEM. Puffer im Bindungstest: 0,1 M KNaPP pH 7,4. Die angegebenen Dissoziationskonstanten wurden aus den Anfangssteigungen der Kurven ermittelt. Berechnungsgrundlage für BK(Eluat): 100 µl Con A-Sepharose-Eluat (0,17 mg Protein/ml, vgl. Tab. 3) wurden bei einem Gesamtvolumen von 250 µl im Bindungstest eingesetzt. BK wird angegeben in Menge an Bindungsstellen pro mg Eluat-Protein.

tät durch NEM inhibierbar.

	% Abbau	Protein [mg/ml]
Con A-Sepharose-Eluat	0,4	0,17
Con A-Sepharose-Überst.	6.0	0,42
Extrakt	5,5	0,9

Tab. 3 Verteilung der Insulin-Abbauaktivität und des Proteins zwischen Con A-Sepharose-Eluat, Con A-Sepharose-Überstand und dem Membranextrakt einer typischen Con A-Sepharose-Behandlung.

In Tabelle 3 wird die Verteilung der Insulin-Abbauaktivität und des Proteins bei der Con A-Sepharose-Behandlung von Membranextrakt angegeben. Die Proteinbestimmung zeigt, daß offensichtlich ein erheblicher Teil des Extraktproteins irreversibel an Con A-Sepharose gebunden wird: der Con A-Sepharose-Überstand enthält 45% des Extraktproteins, das Eluat 20%. Der Fehlbetrag von 35% vermindert sich um die Hälfte, wenn man den Teil des Proteins berücksichtigt, den man nach ausgiebigem Waschen der Con A-Sepharose in den Waschlösungen wiederfindet. Ca. 20% des Extraktproteins bleiben jedoch auch bei Verwendung der optimalen Elutionsbedingungen verschwunden, müssen also irreversibel gebunden sein. Ein ähnliches Ergebnis erhält man auch in einem anderen Versuch: inkubiert man Con A-Sepharose-Überstand mit frischer Con A-Sepharose (2 Std. bei 4°C), so enthält er anschließend deutlich weniger Protein, Insulin-Bindungsaktivität und -Abbauaktivität, ohne daß diese sich von der frisch zugesetzten Con A-Sepharose eluieren ließen. Es ist z.Zt. noch unklar, welche Ursachen diesen Befunden zugrundeliegen.

Mit den Proteinkonzentrationen aus Tabelle 3 läßt sich der Reinigungsfaktor für die Teilreinigung des Rezeptors mittels Con A-Sepharose bestimmen: das Eluat enthält ca. 20% des Extraktproteins und, wie schon erwähnt, 75 - 80% der Bindungsaktivität des Extrakts, man erhält also 4-fache Reinigung.

5.4. CON A-FÄLLUNG VON MEMBRANEXTRAKT

5.4.1. Durchführung der Con A-Fällung

Neben den geschilderten Versuchen zur Teilreinigung des Insulinrezeptors mittels Con A-Sepharose wurde die Möglichkeit der direkten Fällung des Rezeptors aus Membranextrakt mit Con A untersucht. Die im folgenden beschriebenen Ergebnisse liegen inzwischen in gekürzter Form als Veröffentlichung vor (85).

Als grundlegendes Resultat wurde gefunden, daß sich der Insulinrezeptor durch Con A direkt aus Tritonextrakt ausfällen und nach Abzentrifugieren des Präzipitats aus diesem mit MeMan wieder eluieren läßt. Dabei hängt die Menge des ausgefällten Rezeptors von der Menge des zugegebenen Con A ab. Abb. 13 zeigt die Verteilung der Bindungsaktivität, der Insulin-Abbauaktivität und des Proteins zwischen Con A-Eluat und Con A-Überstand (vgl. Begriffsbestimmung in 4.9.) in Abhängigkeit von der zur Fällung eingesetzten Con A-Konzentration. Mit steigender Con A-Konzentration lassen sich bis zu 80% der Bindungsaktivität ausfällen und aus dem Eluat wieder eluieren, ca. 20% werden nicht gefällt und verbleiben im Con A-Überstand. Die Insulin-Abbauaktivität wird ebenfalls nicht durch Con A gefällt, das gewonnene Con A-Eluat ist daher praktisch frei von Abbau. Diese Ergebnisse stimmen also vollständig mit den Resultaten für Con A-Sepharose überein.

Die verschiedenen Parameter der Con A-Fällung wurden anschließend eingehender untersucht. Abb. 14 zeigt die Abhängigkeit der Con A-Konzentration, die zur maximalen Ausfällung des Rezeptors benötigt wird, von der Proteinkonzen-

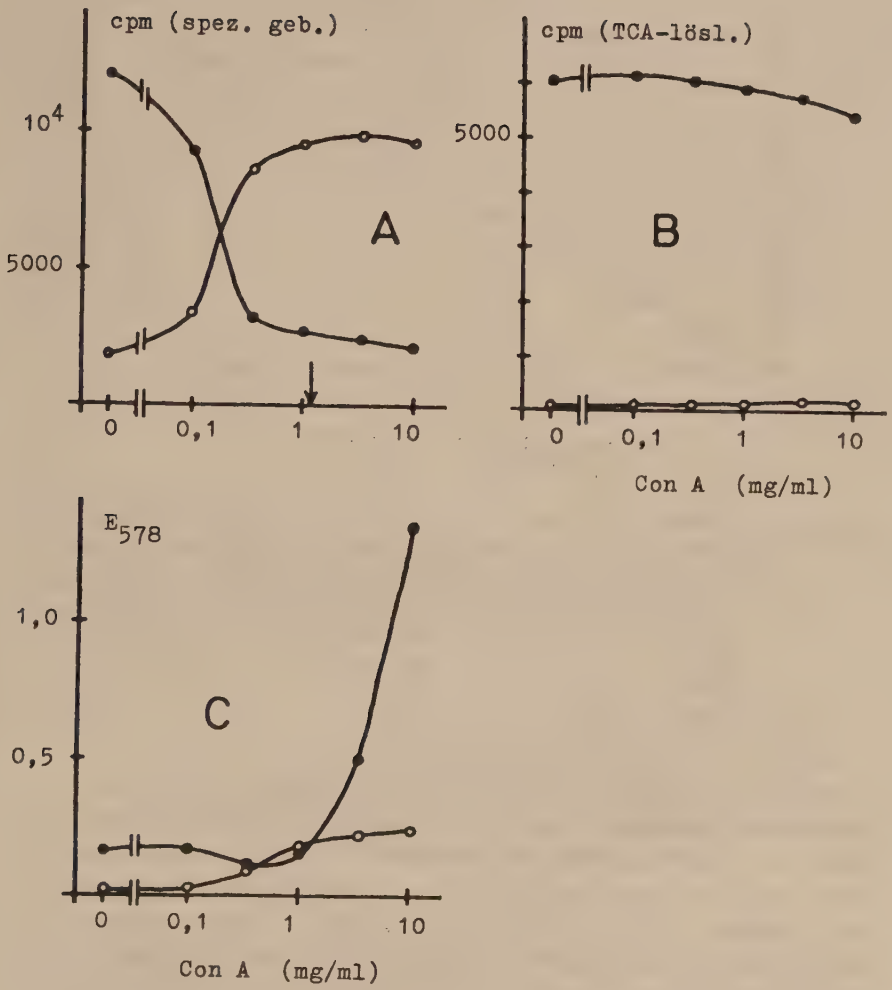


Abb. 13 Verteilung der spezifischen Bindung (A), der Insulin-Abbauaktivität (B) und des Proteins (C) zwischen Con A-Eluat (o) und Con A-Überstand (●) in Abhängigkeit von der zur Fällung eingesetzten Con A-Konzentration. 0,1% Membranextrakt (1,3 mg/ml) wurde mit den angegebenen Con A-Konzentrationen gefällt und jeweils spezifische Bindung, Insulinabbau und Proteingehalt im Con A-Eluat und -Überstand bestimmt. Puffer im Bindungstest: 0,1 M KNaPP pH 7,4. Der Pfeil in (A) bezeichnet die für die Fällung dieses Extraktes optimale Con A-Konzentration.

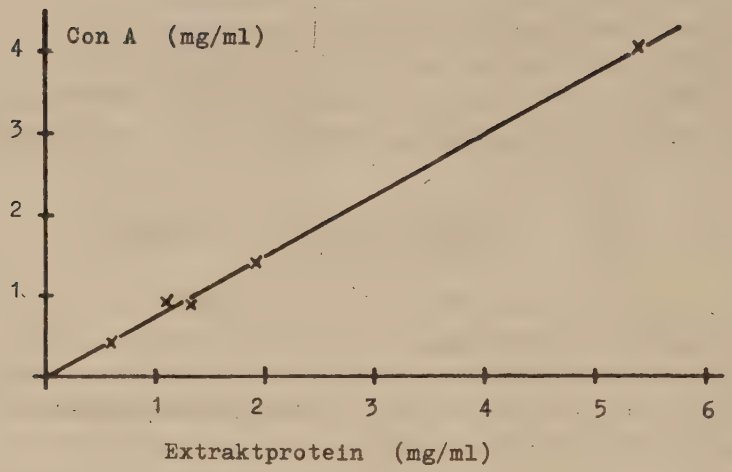


Abb. 14 Abhängigkeit der für die Fällung optimalen Con A-Konzentration von der Proteinkonzentration des eingesetzten Membranextraktes. Der in Abb. 13 A gezeigte Versuch wurde für Extrakte unterschiedlicher Proteinkonzentration wiederholt und die jeweils zur maximalen Fällung der Bindungsaktivität benötigten Con A-Konzentrationen wie in Abb. 13 A (Pfeil) bestimmt.

tration des eingesetzten Extrakts. Man erhält eine proportionale Abhängigkeit mit einem Konzentrationsverhältnis von Con A zu Extraktprotein von ungefähr 1 : 1. Con A-Konzentrationen, die das Verhältnis 1 : 1 wesentlich überschreiten, sollten ebenso vermieden werden wie die Verwendung von Extrakten mit zu hohem Proteingehalt. In beiden Fällen wird durch starke Präzipitatbildung anderes Protein mitgerissen. Die besten Ergebnisse wurden mit Extrakten eines Proteingehaltes von 0,5 - 1,5 mg/ml erzielt. Bei zu geringem Gehalt der rezeptorhaltigen Lösung an Protein, insbesondere an Glykoprotein, sind gleichfalls schlechte Fällungsresultate zu erwarten. So gelang es bisher nicht, den Rezeptor aus Fraktionen von Sepharose 4B CL-Säulenläufen vollständig zu fällen und zu eluieren.

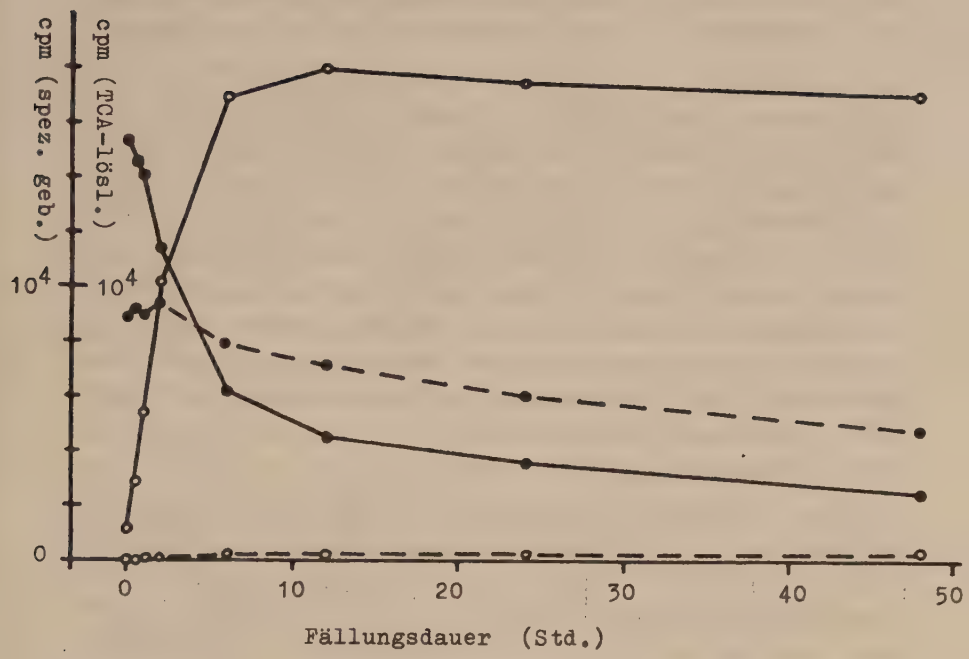


Abb. 15 Zeitabhängigkeit der Con A-Fällung. Membranextrakt wurde mit Con A gefällt. Zu den angegebenen Zeiten wurde das Präzipitat abzentrifugiert, eluiert und die spezifische Bindung (————) und der Insulinabbau (— — — —) im Con A-Eluat (o) und Con A-Überstand (●) bestimmt. Puffer im Bindungstest: 0,1 M KNaPP.

Alle Con A-Fällungen wurden zur Vermeidung von Abbauvorgängen bei 4°C durchgeführt. Bei dieser Temperatur ist die Fällung nach 12 - 15 Std. beendet (Abb. 15). Während die Bindung des Con A-Eluates auch bei verlängerter Fällungsdauer konstant bleibt, nimmt sowohl die Bindungs- wie auch die Abbauaktivität im Con A-Überstand mit der Fällungszeit ab. Es dürfte sich hier um denselben Effekt handeln, der auch schon im vorigen Kapitel bei der Nachbehandlung von Con A-Sepharose-Überstand mit frischer Con A-Sepharose beschrieben wurde: Con A scheint zur Inaktivierung einer oder

mehrerer Insulin-bindender und -abbauender Komponenten im Con A-Überstand bzw. Con A-Sepharose-Überstand zu führen.

Con A benötigt zur Bindung von Glykoproteinen Ca^{++} und Mn^{++}. Anfangs wurden beide Ionen in einer Konzentration von jeweils 3 mM eingesetzt. Dies führt in Phosphatpuffern zum Ausfallen von Kalziumphosphat, das die Con A-Fällung jedoch nicht stört und wie jede verbleibende Trübung am Schluß durch Zentrifugation des Con A-Eluates entfernt werden kann. Es zeigte sich jedoch, daß die Con A-Fällung ebensogut mit einer Ionenkonzentration von 0,3 mM durchgeführt werden kann, bei der kein Kalziumphosphat mehr ausfällt. Ein Zusatz von Mg^{++} hatte keinen Einfluß auf die Con A-Fällung. Ca^{++} und Mn^{++} stören in der Konzentration von 0,3 mM geringfügig die Insulin-Rezeptor-Bindung.

Zur Ermittlung der optimalen Geschwindigkeit beim Abzentrifugieren des Con A-Präzipitats wurde zwischen 6.000 x g und 20.000 x g variiert. Obwohl die Con A-Überstände von 6.000 x g-Zentrifugationen meist optisch klar waren, ließ sich durch höhere Drehzahlen doch noch mehr Bindungsaktivität abzentrifugieren. Andererseits war jedoch das Pellet einer 20.000 x g-Zentrifugation so fest, daß es sich bei der Elution nur sehr schwer auflösen ließ. Als Kompromiss wird daher mit 10.000 x g zentrifugiert. Auf die Verteilung der Insulin-Abbauaktivität zwischen Con A-Überstand und Con A-Eluat hat die Zentrifugationsgeschwindigkeit keinen Einfluß.

Zum Waschen des abzentrifugierten Con A-Präzipitats im Zentrifugenglas vor der Zugabe des Elutionspuffers wurden zwei Methoden verglichen: 1) Resuspendieren des Pellets in Waschpuffer und Zentrifugieren, 2) vorsichtiges Auffüllen und Abdekantieren mit Waschpuffer bei intaktem Pellet. Das aufwendigere 1. Verfahren ergab keinen Vorteil gegenüber dem 2. Verfahren, als einziger Unterschied war der Proteingehalt des Con A-Eluates nach Resuspension etwas vermindert.

Bei den Untersuchungen zur Elution des Rezeptors aus dem Con A-Präzipitat wurde z.T. auf die Ergebnisse aus den Versuchen mit Con A-Sepharose zurückgegriffen. So wurde nur

noch die Elutionswirkung verschiedener Zucker bei 4°C und 23°C getestet (Tabelle 4). Vergleicht man die Werte für die Elutionsbedingungen von 5 Std. und 23°C, so hat 0,3 - 0,5 M MeMan 100% Elutionswirkung, 0,1 M MeMan 86%, 0,5 M α-Methyl-D-Glucosid 88% und 0,5 M Glucose 23%. Die beste Elution wird also wie bei der Con A-Sepharose-Behandlung mit 0,3 - 0,5 M MeMan (1 Std. bei 23°C oder 5 - 10 Std. bei 4°C) erreicht. Hierzu muß allerdings während der Elution mit einem Rührfisch gut gerührt werden.

In der Reihenfolge ihrer Elutionswirkung sind die genannten Zucker in der Lage, die Fällung des Insulinrezeptors mit Con A zu verhindern: die Inhibierung mit 0,3 - 0,5 M MeMan beträgt 100%, mit 0,1 M MeMan 94%, mit 0,3 M α-Methyl-D-Glucosid 93% und mit 0,3 M Glucose 51% (die Prozentzahlen geben die Höhe der Bindungsaktivität im Con A-Überstand im Vergleich zum Extrakt an, wenn dieser in Gegenwart der genannten Zucker Con A-gefällt wurde; die Bindungsaktivität wurde jeweils in Anwesenheit von NEM bestimmt). EDTA · Na_2 und o-Phenanthrolin inhibieren die Con A-Fällung nicht.

5.4.2. Auswertung der Con A-Fällung

Das Bindungsverhalten von Con A-Eluat und Con A-Überstand wurde im Vergleich zum Membranextrakt wie bei der Con A-Sepharose-Behandlung mit und ohne Anwesenheit von NEM mittels Scatchard-Diagrammen ausgewertet (Abb. 16). Die Kurvenverläufe stimmen qualitativ mit denen der Con A-Sepharose-Behandlung (Abb. 12) überein. So erhält man auch für Con A-Eluat ein fast lineares Scatchard-Diagramm mit einer Dissoziationskonstanten von $1{,}85 \cdot 10^{-9}$ M und einer Bindungskapazität von 7,2 pMol / mg Protein. Allerdings wurden für die Con A-Fällung im Vergleich zur Con A-Sepharose-Behandlung durchweg kleinere K_D-Werte erhalten. Der Grund dafür ist unbekannt, möglicherweise liegt er in Unterschieden bei den verwendeten Extrakten oder in Abweichungen der Pufferkonzentrationen und des pH-Wertes zwischen beiden Versuchen.

Ein weiterer Unterschied zeigt sich auch im Scatchard-Dia-

Zucker (Konzentration im Elutionspuffer)	Elut.-Temp. [°C]	Elut.-Dauer [Std.]	Spez. Bindung im Con A-Eluat [cpm(gebund.)]
MeMan			
0,1 M	23	5	17900
	4	5	16300
0,3 M	23	0,2	19800
	23	1	20900
	23	5	20700
	4	1	18000
	4	5	20200
0,5 M	23	0,2	20600
	23	1	21100
	23	5	20900
	4	1	18200
	4	5	20400
α-Methyl-D-Glucosid			
0,5 M	23	5	18500
Glucose			
0,5 M	23	5	4800
Kein Zucker	23	5	200
	4	5	400

Tab. 4 Elution des Insulinrezeptors aus dem Con A-Präzipitat durch MeMan und andere Zucker. 0,1% Membranextrakt wurde Con A-gefällt. Das Präzipitat wurde abzentrifugiert, unter den angegebenen Bedingungen eluiert und die spezifische Bindung im Con A-Eluat bestimmt. Puffer im Bindungstest: 0,1 M KNaPP pH 7,4.

A

K_D-Werte (M):

Eluat: $1{,}85 \cdot 10^{-9}$

Überst.: $1{,}99 \cdot 10^{-9}$

Extr.: $2{,}06 \cdot 10^{-9}$

BK (Eluat):

7,2 pMol/mg

B

K_D-Werte (M):

Eluat: $2{,}02 \cdot 10^{-9}$

Überst.: $0{,}93 \cdot 10^{-9}$

$2{,}03 \cdot 10^{-9}$

Extr.: $1{,}9 \cdot 10^{-9}$

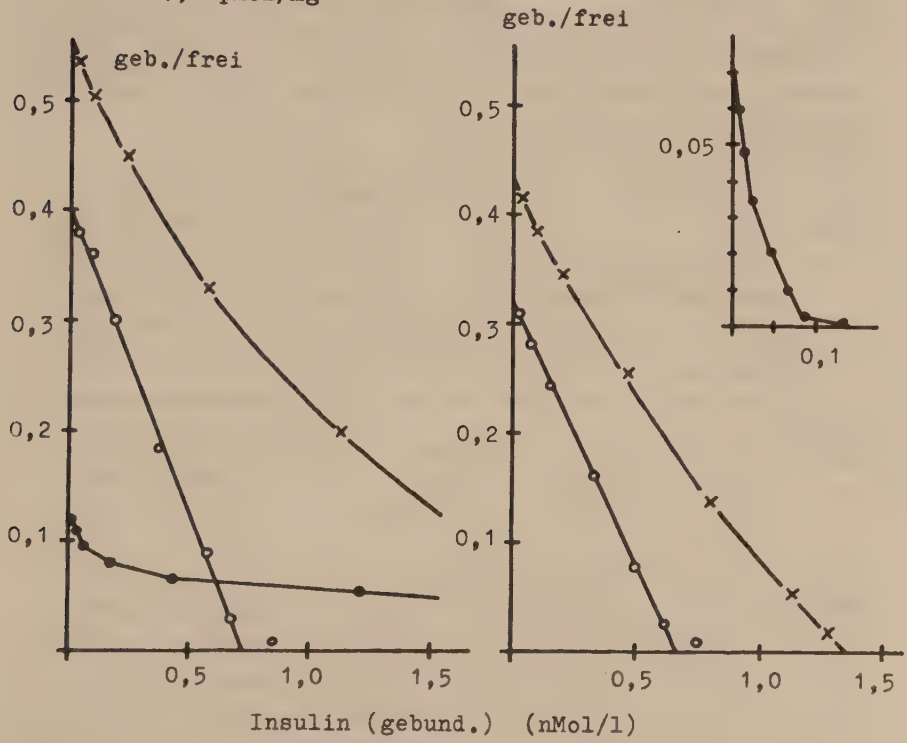


Abb. 16 Scatchard-Analyse der Insulinbindung von Con A-Eluat (○), Con A-Überstand (●) und Membranextrakt (×) aus einer Con A-Fällung von 0,1% Membranextrakt (1,3 mg Protein/ml). A: Bindungstest ohne Abbauinhibitor. B: Bindungstest in Gegenwart von 2 mM NEM. Puffer im Bindungstest: 0,1 M KNaPP pH 7,4. Die Dissoziationskonstanten für den Con A-Überstand mit NEM wurden nach (74) ermittelt, die anderen aus den Anfangssteigungen der Kurven berechnet. Berechnungsgrundlage für BK(Eluat): vgl. Legende zu Abb.12. Der Gehalt des Con A-Eluates an Extraktprotein wurde zu 0,25 mg/ml angenommen (= 19% des Proteingehalts des Extrakts, in Analogie zu Tab. 3).

gramm des Con A-Überstandes. Bei Zugabe von NEM bleibt eine Restbindung mit offensichtlich 2 Komponenten übrig (Inset in Abb. 16 B), von denen die eine aufgrund ihres K_D-Wertes mit dem Rezeptor des Con A-Eluates übereinstimmen könnte. Das würde bedeuten, daß dieser durch Con A nicht vollständig ausgefällt wurde. Die Bedeutung der 2. Komponente mit ihrem wesentlich kleineren K_D-Wert ist z.Zt. noch unklar.

Wie beim Con A-Sepharose-Eluat ist auch beim Con A-Eluat die Steigung der Scatchard-Kurve in Anwesenheit von NEM etwas flacher. Die Ursache liegt in der leichten Störung der Insulin-Rezeptor-Bindung durch NEM.

	% Abbau	Protein [mg/ml]
Con A-Eluat	0,3	0,81
Con A-Überstand	8,1	1,65
Extrakt	6,7	1,3

Tab. 5 Verteilung der Insulin-Abbauaktivität und des Proteins zwischen Con A-Eluat, Con A-Überstand und dem Membranextrakt einer typischen Con A-Fällung.

In Tabelle 5 wird die Verteilung der Insulin-Abbauaktivität und des Proteins bei der Con A-Fällung von Membranextrakt dargestellt. Wie bei der Con A-Sepharose-Behandlung enthält auch hier das Con A-Eluat nur Spuren an Abbauaktivität. Auffällig ist, daß der Con A-Überstand Insulin stärker abbaut als der Extrakt. Dies ist auf die Anwesenheit von aktivierendem Ca^{++} und Mn^{++} im Con A-Überstand zurückzuführen (vgl. 5.2.2.). Derselbe Effekt trat auch bei der Con A-Sepharose-Behandlung schon geringfügig auf (Tab. 3).

Die Proteinbestimmung in der letzten Spalte von Tabelle 5 ist nur von geringer Aussagekraft, da sowohl im Con A-Eluat als auch im Con A-Überstand Con A in unbekannter Menge enthalten ist. Der Reinigungsfaktor für die Con A-Fällung wurde daher aus der Con A-Sepharose-Behandlung übernommen, wobei angenom-

men wurde, daß beidesmal gleiche Anteile des Extraktproteins an Con A binden. Bezogen auf das Extraktprotein (nicht das Gesamtprotein) im Con A-Eluat erhält man so ebenfalls 4-fache Reinigung.

Das Con A im Eluat läßt sich mittels Gelfiltration leicht abtrennen. Als Trenngel empfiehlt sich Sepharose, an die es nach eigenen Versuchen nicht bindet. Im Gegensatz dazu wird Con A von Sephadex gebunden, jedoch ist diese Bindung schon durch 0,1 M Glucose unterdrückbar.

5.4.3. Einfluß von Con A auf die Insulin-Rezeptor-Bindung

Con A zeigte in verschiedenen Versuchen einen inhibierenden Einfluß auf die Insulin-Rezeptor-Bindung. Das Ausmaß dieser Inhibierung hing davon ab, ob die Zugabe von Con A zum gelösten Rezeptor vor der Zugabe des ^{125}J-Insulins oder gleichzeitig mit dieser erfolgte. Der Effekt war dann am stärksten, wenn Con A bis zur Zugabe des ^{125}J-Insulins genügend Zeit zur vollständigen Assoziation an den Rezeptor hatte. Die Inhibierung konnte durch 0,1 - 0,3 M MeMan verhindert oder rückgängig gemacht werden.

In der Literatur wird ebenfalls von einer Verminderung der Insulin-Rezeptor-Bindung durch Con A berichtet (6,10,12,24, 62,79), sowohl aufgrund einer Reduktion der Rezeptoraffinität als auch der Rezeptorzahl. Die Inhibierung betraf dabei besonders die hochaffinen Rezeptoren (10,12,31,62), was zum Teil zu einer Linearisierung der Scatchard-Diagramme (12,62) bzw. einer Verminderung der negativen Kooperativität (31) führte. In Gegenwart von MeMan traten die Effekte nicht auf.

Allgemein wurde bisher als Grund dieser Inhibierung eine sterische Behinderung der Insulin-Bindungsstelle durch das ebenfalls am Rezeptor gebundene Con A angenommen. In einer neueren Arbeit (79) allerdings wird die Verminderung der Insulin-Rezeptor-Bindung, zumindest im Fall des gelösten Rezeptors, auf Aggregation und Ausfällung des Rezeptors durch Con A zurückgeführt, wie sie in 5.4.1. beschrieben wurde. Ob diese Erklärung zutrifft und ob sie auch für die Inhibierung

der Insulinbindung an Membranen und Zellen eine Rolle spielt, müssen weitere Versuche zeigen.

5.5. AUFTRENNUNG DER REZEPTORAKTIVITÄT MITTELS GELFILTRATION IN PEAK I UND PEAK II

Im Verlauf von Untersuchungen zur Stabilität des Insulinrezeptors gegenüber unterschiedlichen Lagerungsbedingungen (vgl. 5.6.) wurde auch geprüft, ob der pH und die Ionenstärke des Puffers, in dem der Rezeptor gelagert wurde, einen Einfluß auf die Haltbarkeit der Bindungsaktivität hatte. Dazu wurden die Fraktionen aus dem 1. Bindungspeak eines Sepharose 4B CL-Säulenlaufs von Extrakt jeweils geteilt und die eine Hälfte jeder Fraktion unverändert im Elutionspuffer (0,01 M KNaPP pH 7,4/ 0,1% Triton) belassen, die andere Hälfte durch Zugabe von konzentriertem basischen KNaPP auf 0,1 M und pH 7,65 eingestellt. Die Haltbarkeit der Fraktionen war in beiden Puffern gleichgut, jedoch erhielt man bei der Bestimmung der spezifischen Bindung der Fraktionen für jeden der beiden Puffern einen anderen Verlauf des 1. Bindungspeaks.

Daraufhin wurde die spezifische Bindung im Eluat von Gelfiltrationen systematisch unter verschiedenen pH- und Ionenstärke-Bedingungen ausgetestet (zur Einstellung von pH und Ionenstärke im Bindungstest vgl. 4.4.2.). Abb. 17 zeigt die Auswertung eines typischen Säulenlaufs. Man sieht, daß sich der 1. Bindungspeak offenbar aus zwei Einzelpeaks zusammensetzt, die im folgenden mit Peak I und Peak II bezeichnet werden. Die Höhe der beiden Peaks hängt in unterschiedlicher Weise vom pH-Wert und der Ionenstärke des Puffers ab, der beim Austesten des Eluats im Bindungstest eingesetzt wurde. So bindet Peak I am besten bei hohem pH und hoher Ionenstärke, dagegen überhaupt nicht bei niedriger Ionenstärke, während Peak II bevorzugt bei niedrigem pH und niedriger Ionenstärke bindet.

Neben Membranextrakt wurden auch Gelfiltrationen von Con A-Sepharose-Eluat und Con A-Eluat durchgeführt. Wie Abb. 18

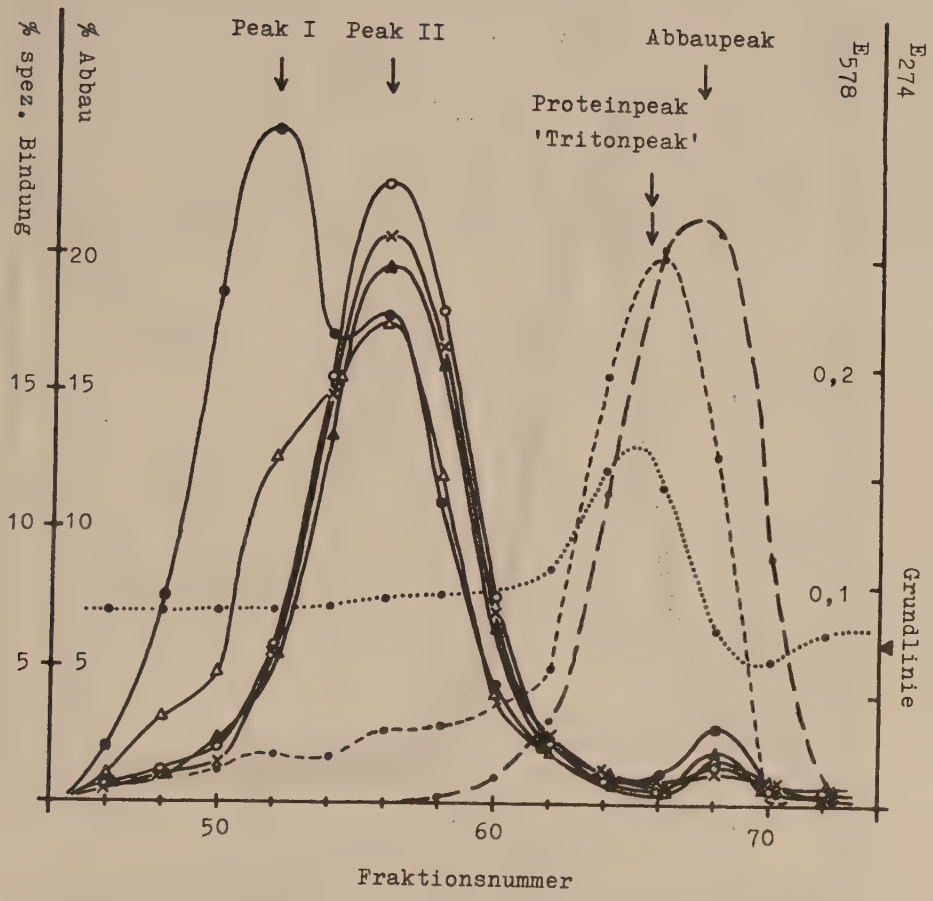


Abb. 17 pH- und Ionenstärkeabhängigkeit der spezifischen Bindung im Eluat einer Gelfiltration von Membranextrakt an Sepharose 4B CL. 5 ml 0,5% Extrakt wurden an einer Säule (2,7 × 120 cm) aufgetrennt und die spezifische Bindung im Eluat in 0,01 M KNaPP pH 7,0 (○), 0,01 M KNaPP pH 7,4 (×), 0,01 M KNaPP pH 7,7 (▲), 0,1 M KNaPP pH 7,4 (△) und 0,1 M KNaPP pH 8,0 (●) bestimmt. —— ——: Insulinabbau, - - - - - - : Protein, ·····: Extinktion bei 274 nm.

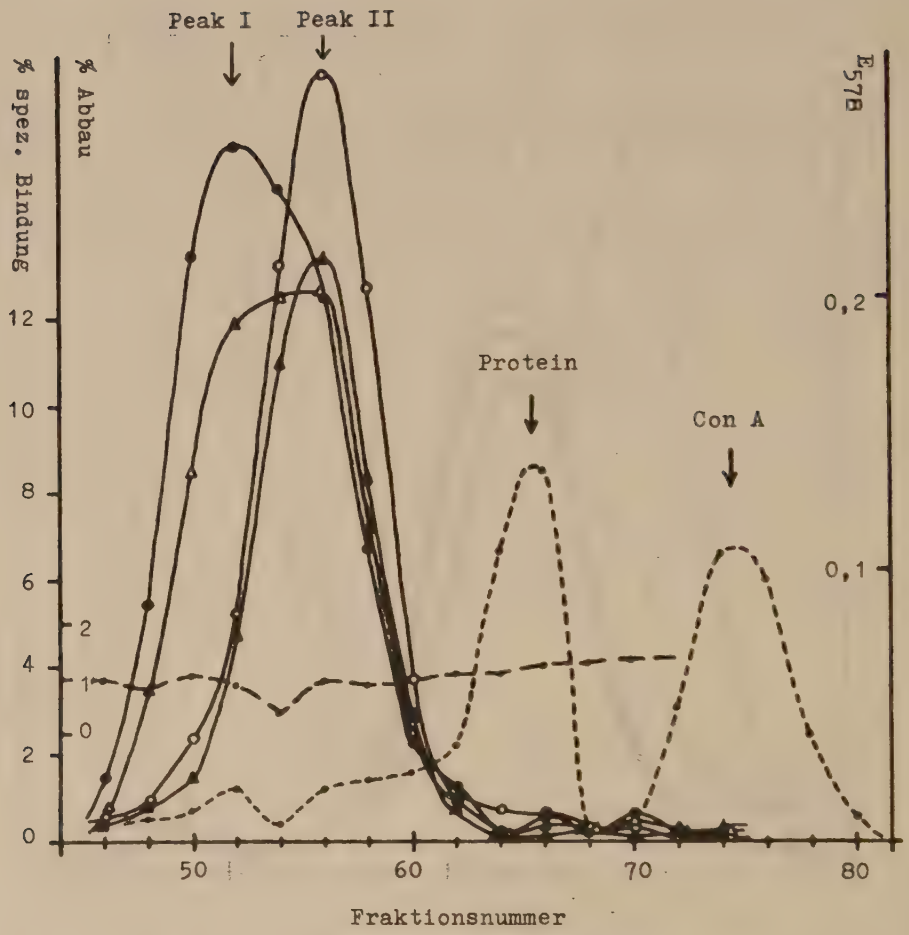


Abb. 18 pH- und Ionenstärkeabhängigkeit der spezifischen Bindung im Eluat einer Gelfiltration von Con A-Eluat an Sepharose 4B CL. 25 ml 0,1% Extrakt wurden Con A-gefällt. Das Präzipitat wurde mit 10 ml 0,1 M KNaPP pH 7,4/ 0,1% Triton/ 0,3 M MeMan eluiert und dieses Eluat an einer Säule (2,7 x 120 cm) aufgetrennt. Um eine Rückbindung von Con A und Rezeptor zu vermeiden, war die Säule vor dem Auftragen des Con A-Eluates mit 200 ml 0,01 M KNaPP pH 7,4/ 0,1% Triton/ 0,1 M MeMan äquilibriert worden. Die spezifische Bindung im Eluat wurde in 0,01 M KNaPP pH 7,0 (○), 0,01 M KNaPP pH 7,7 (▲), 0,1 M KNaPP pH 7,4 (△) und 0,1 M KNaPP pH 8,0 (●) bestimmt. — — —: Insulinabbau, -------: Protein.

am Beispiel von Con A-Eluat zeigt, ergibt sich das gleiche Bild bezüglich Lage und Bindungsverhalten von Peak I und Peak II. Das bedeutet, daß beide Rezeptorspezies, aus Peak I wie aus Peak II, an Con A binden, beide also Glykoproteine sind. Abb. 18 zeigt außerdem, daß bei der Gelfiltration von Con A-Eluat (dasselbe gilt auch für Con A-Sepharose-Eluat) sowohl der Abbaupeak als auch der dazugehörige Bindungspeak fehlen. Bei der Proteinbestimmung erhält man neben dem durch Triton verursachten Peak noch einen weiteren durch Con A bedingten Peak.

Eine völlige Trennung von Peak I und Peak II über Gelfiltration gelang bisher nicht. Auch durch Verwendung einer längeren Säule (2 x 200 cm, vgl. Abb. 20) oder durch Herabsetzung der aufgetragenen Extraktmenge auf ein Fünftel ließ sich die Überlappung der beiden Peaks nicht vermeiden.

Die Rechromatografie von Peak I und Peak II ergab wieder symmetrische Peaks, die in derselben Position eluiert wurden und dasselbe Bindungsverhalten zeigten wie die jeweiligen Ausgangspeaks (Abb. 19). Gelegentlich traten vor und hinter den Hauptpeaks noch kleine Nebenpeaks auf, deren Bedeutung jedoch noch unklar ist. Die einheitliche Rechromatografierbarkeit von Peak I und Peak II schließt aus, daß während des Säulenlaufs ein reversibler oder irreversibler Umwandlungsprozess zwischen den beiden Peaks abläuft.

Für die später (5.10. und 5.11.) beschriebenen Experimente mit photoaffinitätsmarkiertem Insulinrezeptor war es wichtig, das Bindungsverhalten der photolysierbaren Insulinderivate ^{125}J-MABI und ^{125}J-DABI im Vergleich mit ^{125}J-Insulin zu prüfen. Die Bindungsfähigkeit der Derivate geht von ^{125}J-Insulin über ^{125}J - MABI und ^{125}J-DABI zurück, wobei sie aber für Peak I und Peak II im gleichen Ausmaß abnimmt (Abb.20). Beide Rezeptorspezies können also photoaffinitätsmarkiert werden, wobei die Markierung durch die Wahl der richtigen pH- und Ionenstärkebedingungen bei der Inkubation gesteigert und in ihrer Richtung auf eine der beiden Rezeptorspezies gelenkt werden kann. Die Abbauaktivität des Extrakts

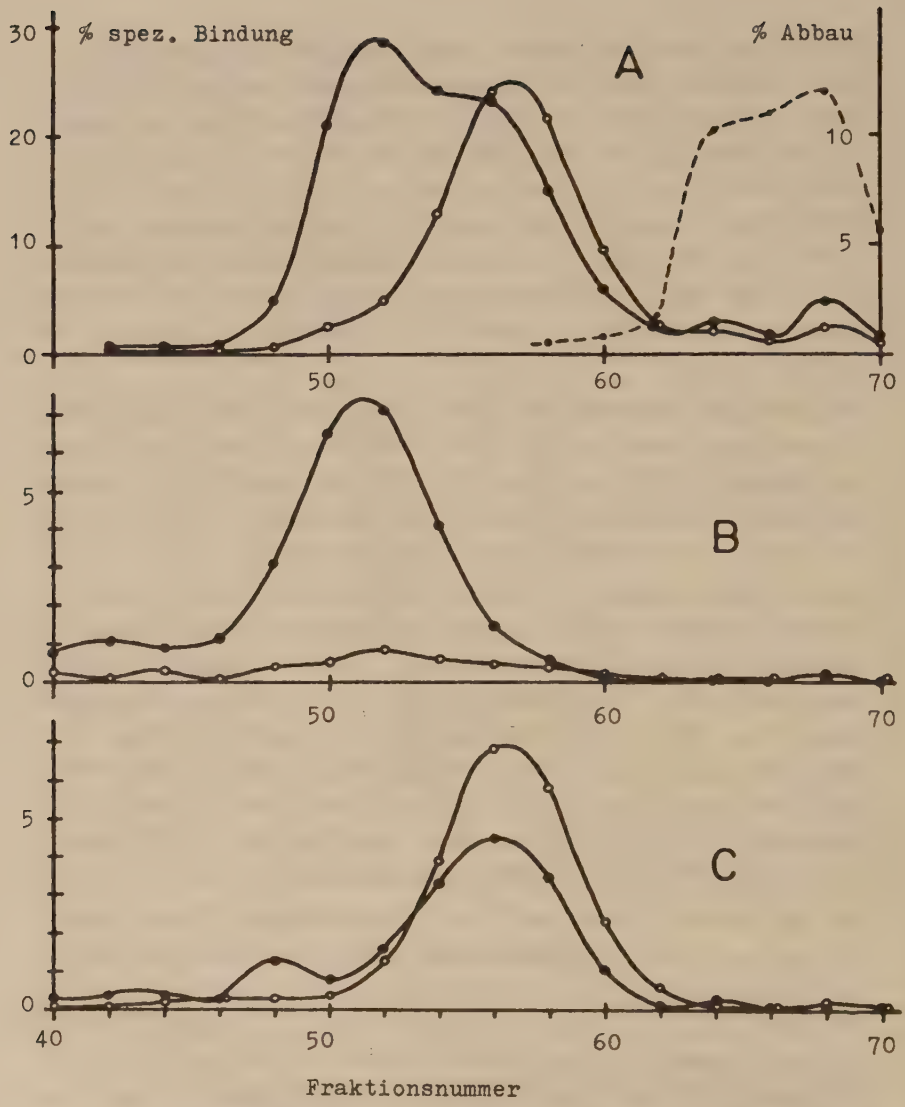


Abb. 19 Rechromatografie von Peak I und Peak II an Sepharose 4B CL. A: 5 ml 0,5% Extrakt wurden an einer Säule (2,7 x 120 cm) aufgetrennt. Fraktion 48 - 53 und 56 - 60 wurden jeweils gesammelt, lyophilisiert, in 7 ml H_2O aufgenommen und an derselben Säule rechromatografiert (B, C). Die spezifische Bindung im Eluat wurde jeweils in 0,01 M KNaPP pH 7,0 (○) und 0,1 M KNaPP pH 8,0 (●) bestimmt. – – – – –: Insulinabbau.

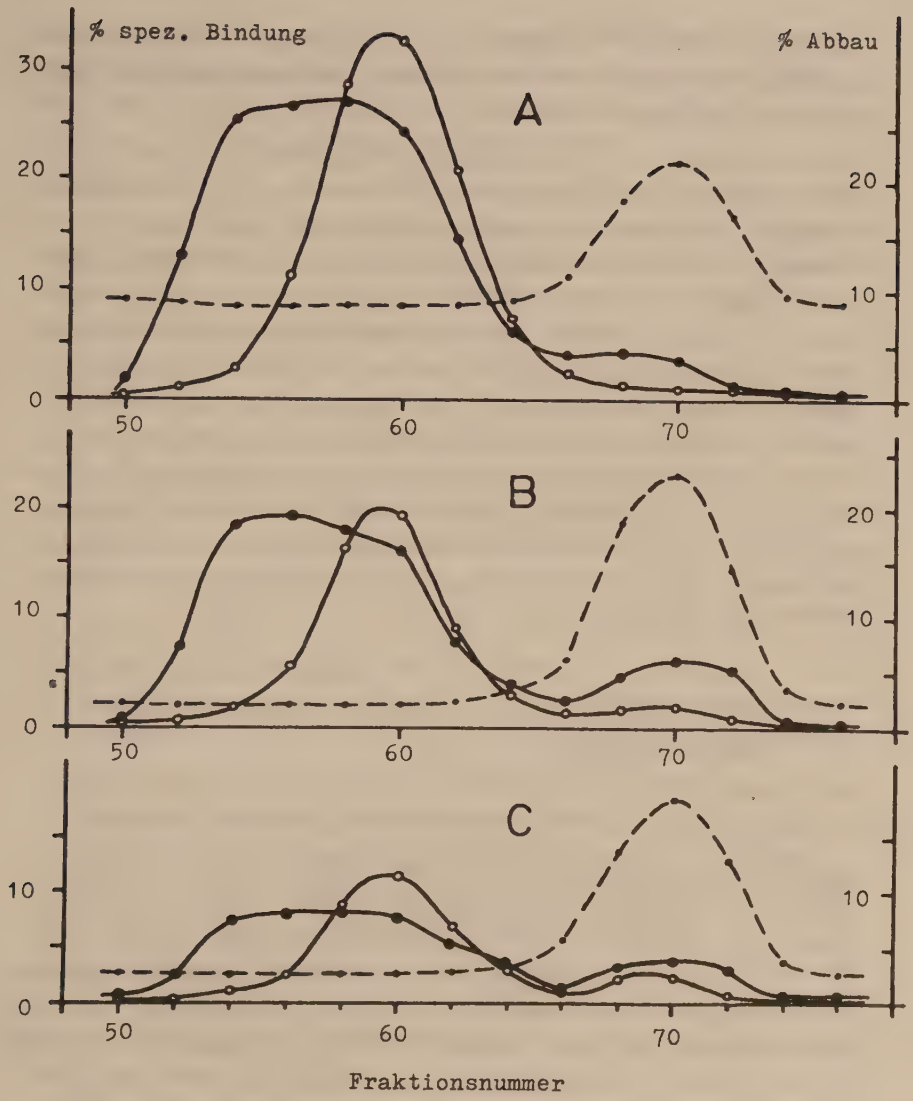


Abb. 20 Spezifische Bindung und Abbau von 125J-Insulin (A), 125J-MABI (B) und 125J-DABI (C) im Eluat einer Gelfiltration von Membranextrakt an Sepharose 4B CL. 5 ml 0,5% Extrakt wurden an einer Säule (2 x 200 cm) aufgetrennt und die spezifische Bindung und der Abbau im Eluat mit den drei Insulinderivaten bestimmt.
○——○: spez. Bindung in 0,01 M KNaPP pH 7,0,
●——●: spez. Bindung in 0,1 M KNaPP pH 8,0,
— — —: Abbau (nicht korrigiert, vgl. 4.5.).

scheint zwischen ^{125}J-Insulin, ^{125}J-MABI und ^{125}J-DABI nicht wesentlich zu unterscheiden, wie der Abbaupeak und der dazugehörige Bindungspeak zeigen.

Bei den in Abb. 17 - 20 dargestellten Versuchen wurde als Elutionspuffer im Säulenlauf 0,01 M KNaPP pH 7,4/ 0,1% Triton verwendet. Gleiche Elutionsdiagramme erhält man auch bei Verwendung von 0,01 M Tris-HCl-Puffer pH 7,7/ 0,1% Triton bzw. 0,05 M KNaPP pH 7,4/ 0,1 M NaCl/ 0,1% Triton/ 0,02% Na-Azid (vgl. 4.7.2. und 4.7.3.). Allerdings gleichen sich die Elutionsdiagramme nur bezüglich der Abstände der drei Peaks (Peak I, Peak II, Abbaupeak) voneinander, insgesamt jedoch werden alle Peaks beim Tris-HCl-Puffer einige Fraktionen früher, beim KNaPP / NaCl-Puffer einige Fraktionen später als beim 0,01 M KNaPP eluiert. Vermutlich liegt dies an unterschiedlich starken Wechselwirkungen zwischen Protein und Sulfatgruppen des Sepharose-Gels bei den verschiedenen Ionenstärken der Puffer (96).

5.6. STABILITÄT VON PEAK I, PEAK II UND DER INSULIN-ABBAUAKTIVITÄT

Die Stabilität von Peak I und Peak II wurde gegenüber den folgenden Lagerungsbedingungen und Verfahren untersucht:

Lagerung bei -30°C: Bei dieser Temperatur wurden prinzipiell alle rezeptorhaltigen Lösungen wie Extrakt, Säulenlauf-Fraktionen u.a. gelagert. Ihre Aktivität nahm dabei in der Regel über Monate nur langsam ab. Bei Gelfiltration erhielt man mit frisch präpariertem Membranextrakt das gleiche Peak I/Peak II-Elutionsprofil wie mit 2 Monate bei -30°C gelagertem Extrakt. Bis zu 4-maliges hintereinander geschaltetes Einfrieren und Auftauen führte zu keiner Änderung der Rezeptoraktivität.

Lagerung bei 4°C und 23°C: Bei Abwesenheit von Bakterien und Abbauenzymen waren nach 6 Tagen bei 4°C bzw. nach 12 Std. bei 23°C noch ca. 90% der Rezeptoraktivität vorhanden.

Lyophilisation und Dialyse: Nach Lyophilisation liessen sich durchschnittlich 90% der Bindungsaktivität wiederfinden. An-

schliessende Dialyse führte zu keinen Aktivitätsverlusten. Wurde der Rezeptor als Lyophilisat bei 4°C gelagert, fand man nach 2 Tagen Lagerungszeit noch ca. 80 - 90%, nach 3 Wochen ca. 70% der Bindungsaktivität wieder.

Rechromatografie: Nach Rechromatografie (vgl. Abb. 19) wurden 70 - 100% der Rezeptoraktivität zurückerhalten, vorausgesetzt, daß Ionenaustausch- und andere Effekte des Trenngels durch vorheriges ausgiebiges Äquilibrieren mit Albumin-haltigem Elutionspuffer ausgeschaltet wurden.

Puffer: In der Regel wurde für alle Präparationen, Säulenläufe etc. 0,01 M KNaPP pH 7,4 oder 0,1 M KNaPP pH 7,4 verwendet, in denen Extrakte, Säulenlauf-Fraktionen u.a. sehr gut haltbar waren. Gegenüber 0,01 M Tris-HCl-Puffer pH 7,7 scheint insbesondere Peak II weniger stabil zu sein. Nur kurzzeitig beständig waren Peak I und Peak II in 0,05 M KNaPP pH 7,4/ 0,1 M NaCl/ 0,1% Triton/ 0,02% Na-Azid, dem für Molekulargewichtsbestimmungen verwendeten Puffersystem.

Anwesenheit von Albumin: Durch Zugabe von Albumin als "Schutzprotein" (meist ad 0,1%) zu Elutionspuffern oder Säulenlauf-Fraktionen ließ sich weder eine vollständigere Elution noch eine verbesserte Lagerungsfähigkeit erreichen.

Anwesenheit von Con A: Längere Lagerung bei 4°C oder -30°C in Anwesenheit von Con A, z.B. im Fall von Con A-Eluaten, scheint zu einer Verminderung der Rezeptoraktivität zu führen, selbst wenn die Lösung 0,3 M MeMan enthält.

Zusammenfassend läßt sich also feststellen, daß beide Rezeptorspezies aus Peak I und Peak II relativ stabil gegenüber den verschiedensten Einflüssen sind, Peak II möglicherweise etwas weniger als Peak I.

Im Vergleich dazu ist die Stabilität des Abbaupeaks und des dazugehörigen Bindungspeaks wesentlich geringer. Fraktionen dieser Peaks verlieren ihre Abbau- und Bindungsaktivität z.B. nach 5-stündiger Lagerung bei 23°C oder bei 10-tägiger Aufbewahrung bei 4°C als Lyophilisat, auch gegenüber Lagerung bei 4°C in Lösung oder bei -30°C sind sie erheblich empfind-

licher. Keinen Einfluß auch auf den Abbau- bzw. Bindungspeak hatte mehrmaliges Einfrieren und Auftauen. Die Gegenwart von Albumin scheint die Haltbarkeit beider Peaks etwas zu verbessern, dagegen führte die Anwesenheit von Con A, wie schon in 5.3.2. erwähnt, zu Aktivitätsverlust.

In jedem Fall reagierten die Abbauaktivität und die zugehörige Bindungskativität auf alle genannten Einflüsse jeweils parallel, beide zeigten also gleiches Stabilitätsverhalten. Dies stellt eine weitere Unterstützung der Hypothese dar, daß beiden Peaks ein gemeinsames Molekül zugrundeliegt, das Insulin sowohl bindet als auch abbaut.

5.7. pH- UND IONENSTÄRKEABHÄNGIGKEIT DER INSULINBINDUNG VON PEAK I UND PEAK II

5.7.1. pH- und Ionenstärkeabhängigkeit bei 4°C

Die in 5.5. beschriebenen Ergebnisse zur Abhängigkeit des Bindungsverhaltens von Peak I und Peak II vom pH und der Ionenstärke des Inkubationspuffers wurden durch systematische Untersuchungen weiter vertieft. Im folgenden Versuch wurden Fraktionen aus Peak I und Peak II (Fraktion 50, 52, 54, 56, 58 und 60, vgl. Abb. 17) auf die pH- und Ionenstärkeabhängigkeit ihrer Bindungsaktivität getestet. Abb. 21 zeigt, daß Fraktion 50 und 52 sich gleich verhalten mit minimaler Bindung bei niedriger Ionenstärke und niedrigem pH und maximaler Bindung bei hoher Ionenstärke und hohem pH. Das Optimum liegt bei 0,15 M KNaPP pH 8,0 - 8,1. Höhere Pufferkonzentrationen konnten nicht eingesetzt werden, da bei der Molarität von 0,15 M die Löslichkeitsgrenze von basischem KNaPP bei 4°C erreicht ist. Höhere pH-Werte liessen sich ebenfalls mit KNaPP nur schwer erzielen, da der Elutionspuffer (0,01 M KNaPP pH 7,4), in dem die untersuchten Fraktionen vorlagen, im Bindungstest gegenpuffert.

Die Fraktionen 58 und 60 zeigen ein völlig anderes Bild der pH- und Ionenstärkeabhängigkeit wie Fraktion 50 und 52. Ihr Bindungsoptimum liegt bei möglichst niedriger Ionenstärke

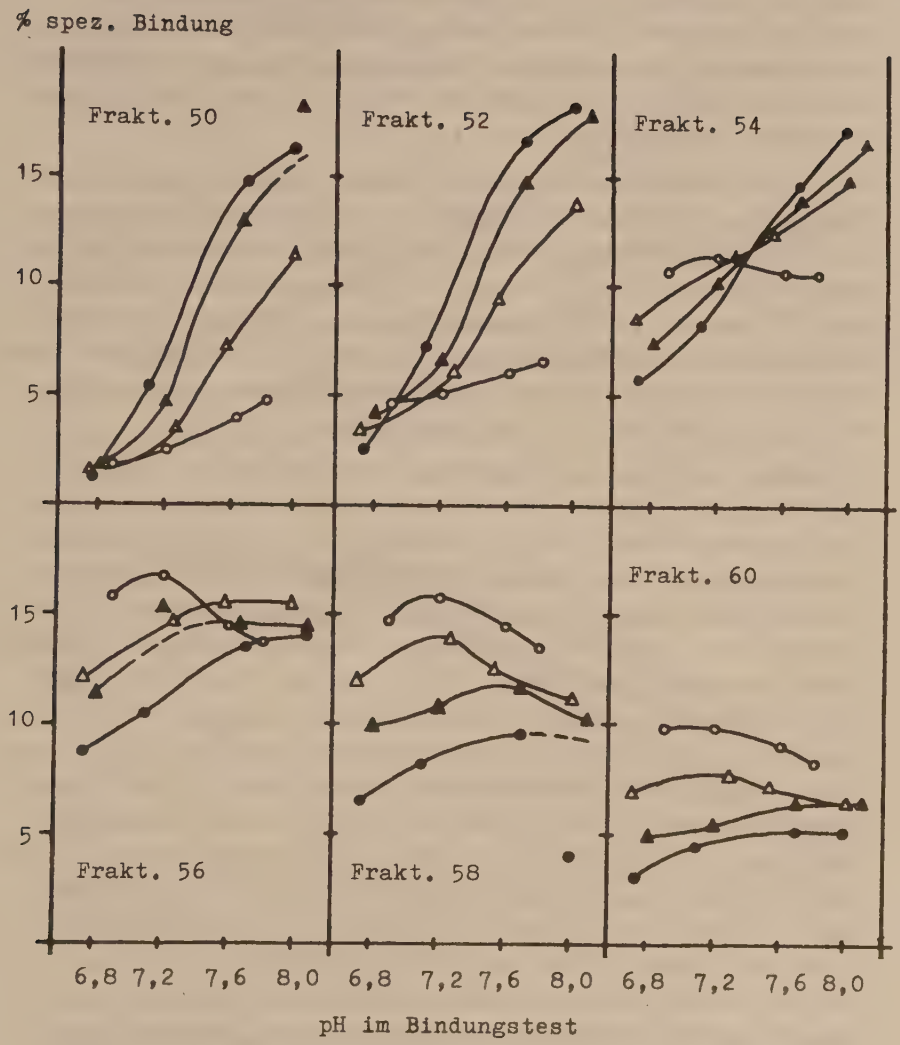


Abb. 21 pH- und Ionenstärkeabhängigkeit der spezifischen Bindung von Fraktionen aus Peak I und Peak II. Die spezifische Bindung von Fraktion 50, 52, 54, 56, 58 und 60 (Position der Fraktionen wie in Abb. 17) wurde in 0,02 M KNaPP (○), 0,056 M KNaPP (△), 0,106 M KNaPP (▲) und 0,15 M KNaPP (●) bei den angegebenen pH-Werten bestimmt.

und einem pH-Wert um 7,2 ("niederionisches Optimum" von Peak II), minimale Bindung erfolgt bei hoher Ionenstärke und niedrigem pH. Mit wachsender Ionenstärke findet bei ihnen eine Verschiebung des pH-Optimums von 7,2 zu 8,0 statt ("hochionisches Optimum" von Peak II).

Die beiden Fraktionen 54 und 56 liegen genau im Bereich der Überlappung von Peak I und Peak II und spiegeln dies auch in der pH- und Ionenstärkeabhängigkeit ihrer Bindung wieder, besonders deutlich bei Fraktion 54. Zusammengenommen bestätigt Abb. 21, was aufgrund der Säulenlauf-Auswertungen mit verschiedenen Puffern in 5.5. auch zu erwarten war: die Existenz zweier in pH- und Ionenstärke-Empfindlichkeit ihrer Bindung völlig unterschiedlicher Rezeptorspezies.

Es wurde bisher davon ausgegangen, daß es sich bei Änderungen des Bindungsverhaltens mit der Pufferkonzentration um einen Ionenstärke-Effekt handelt. Wenn das so ist, müssen dieselben Änderungen auch mit niedermolarem Puffer, dem steigende Konzentrationen eines neutralen Salzes zugesetzt wurden, zu erreichen sein. In einem Vorversuch wurde der Einfluß von 6 einfachen anorganischen Salzen (Na_2SO_4, K_2SO_4, NaCl, KCl, $NaNO_3$, KNO_3) verschiedener Konzentration auf die Bindung von ^{125}J-Insulin an die Rezeptorspezies von Peak I und Peak II bei jeweils optimalem pH (zugrundegelegt wurde 0,056 M KNaPP) untersucht. Wie Abb. 22 zeigt, erhöhen alle Salze mit wachsender Konzentration die Bindung von Peak I bzw. vermindern die Bindung von Peak II, das Bindungsverhalten ist also in beiden Fällen dasselbe wie bei einer Erhöhung der Pufferkonzentration. Der Effekt ist bei den K-Salzen nicht so stark wie bei den Na-Salzen. Die nur schwache Erhöhung der Bindung von Peak I und die starke Erniedrigung bei Peak II im Fall der Nitrate wurden so gedeutet, daß diese neben der Ionenstärke-Wirkung einen generell störenden Effekt auf die Insulin-Rezeptor-Bindung besitzen (evtl. aufgrund oxidierender Wirkung). Ähnliches scheint in schwächerem Umfang auch für die Chloride zu gelten. Als bestgeeignetes Salz wurde daher für die folgenden Versuche Na_2SO_4 ausgewählt, das darüberhinaus den Vor-

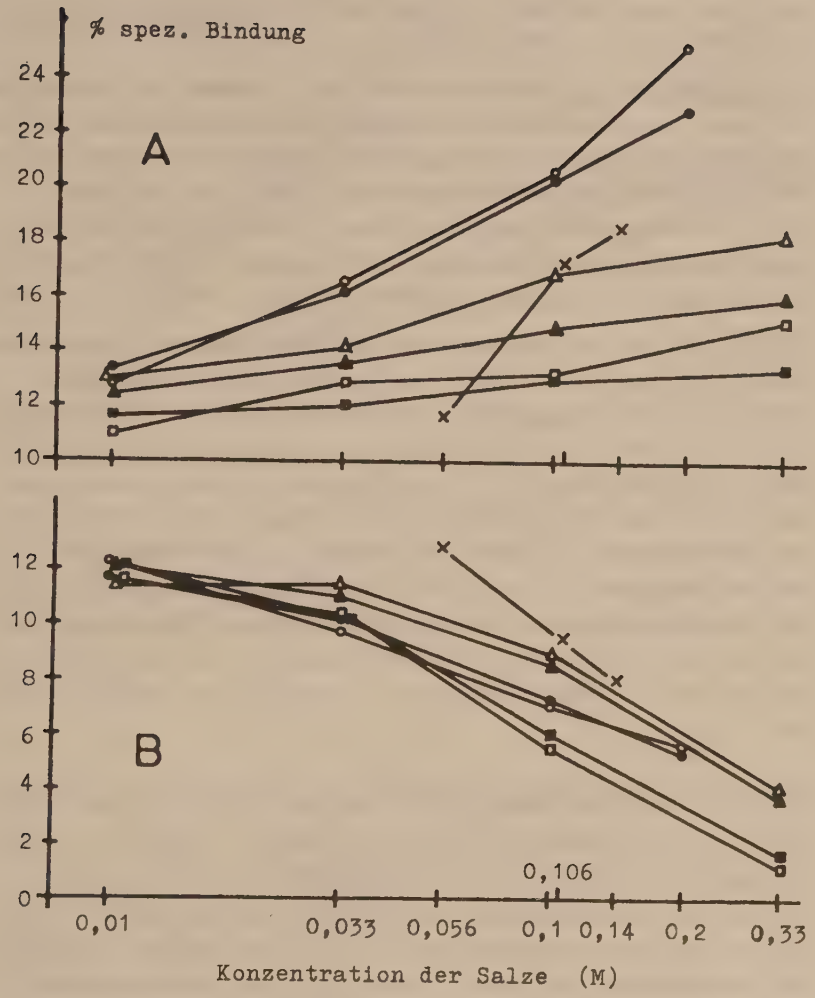


Abb. 22 Einfluß neutraler Salze auf die spezifische Bindung von Peak I (A) und Peak II (B). A: Fraktionen aus Peak I wurden vereinigt und ihre spezifische Bindung in 0,056 M KNaPP pH 8,0 plus der angegebenen Konzentration an Na_2SO_4 (○), K_2SO_4 (●), NaCl (△), KCl (▲), $NaNO_3$ (□) und KNO_3 (■), sowie in KNaPP pH 8,0 der angegebenen Konzentration ohne Salz (×) bestimmt. B: Fraktionen aus Peak II wurden vereinigt und ihre spezifische Bindung in der gleichen Weise, jedoch jeweils bei pH 7,2, untersucht.

teil hat, wegen seiner Zweiwertigkeit wesentlich höhere Ionenstärken zu ermöglichen.

Zwischenbemerkung: Wenn hier und im folgenden von Versuchen mit Peak I und Peak II die Rede ist, so bedeutet das, daß für diese Versuche jeweils eine Fraktion oder mehrere (vereinigte) Fraktionen aus dem aufsteigenden Ast von Peak I bzw. dem absteigenden Ast von Peak II unter Ausschluß der beiden Spitzenfraktionen verwendet wurden, um eine Kontamination durch den jeweils anderen Peak zu vermeiden.

In Abb. 23 ist die pH- und Ionenstärkeabhängigkeit der Insulinbindung von Peak I und Peak II, getestet mit KNaPP + Na_2SO_4, bei 4°C dargestellt. Für beide Peaks wurde ein relativ feines Raster im Bereich ihres jeweiligen Bindungsoptimums verwendet (Abb. 23 A,B), für Peak II außerdem ein grobes Raster über den ganzen pH- und Ionenstärkebereich, um die Verschiebung vom niederionischen zum hochionischen Optimum mit wachsender Ionenstärke zu dokumentieren (Abb. 23 C). Die Diagramme stimmen im Ergebnis völlig mit den Kurvenverläufen der Fraktionen 50 und 52 (als Vertreter von Peak I) bzw. 58 und 60 (als Vertreter von Peak II) in Abb. 21 überein.

5.7.2. pH- und Ionenstärkeabhängigkeit bei 23°C und 37°C

Für die anschließende Untersuchung der pH- und Ionenstärkeabhängigkeit bei 23°C und 37°C wurden in einem Vorversuch zuerst die Assoziationszeiten für die Bindung von ^{125}J-Insulin an die Rezeptorspezies von Peak I und Peak II bei diesen Temperaturen bestimmt (nicht gezeigt): das Bindungsgleichgewicht war bei beiden Peaks bei 23°C nach 4 Std., bei 37°C nach 2 Std. erreicht. Dabei zeigte sich ebenfalls bei beiden Peaks, daß die Bindung bei 23°C und erst recht bei 37°C gegenüber der Bindung bei 4°C stark reduziert war (Abb.24). Wie im vorigen Kapitel schon erwähnt, sind Peak I und Peak II gegenüber 23°C stabil. Die Verminderung der spezifischen Bindung bei erhöhten Temperaturen hat also ihre Ursache in einer veränderten Gleichgewichtslage der Insulin-

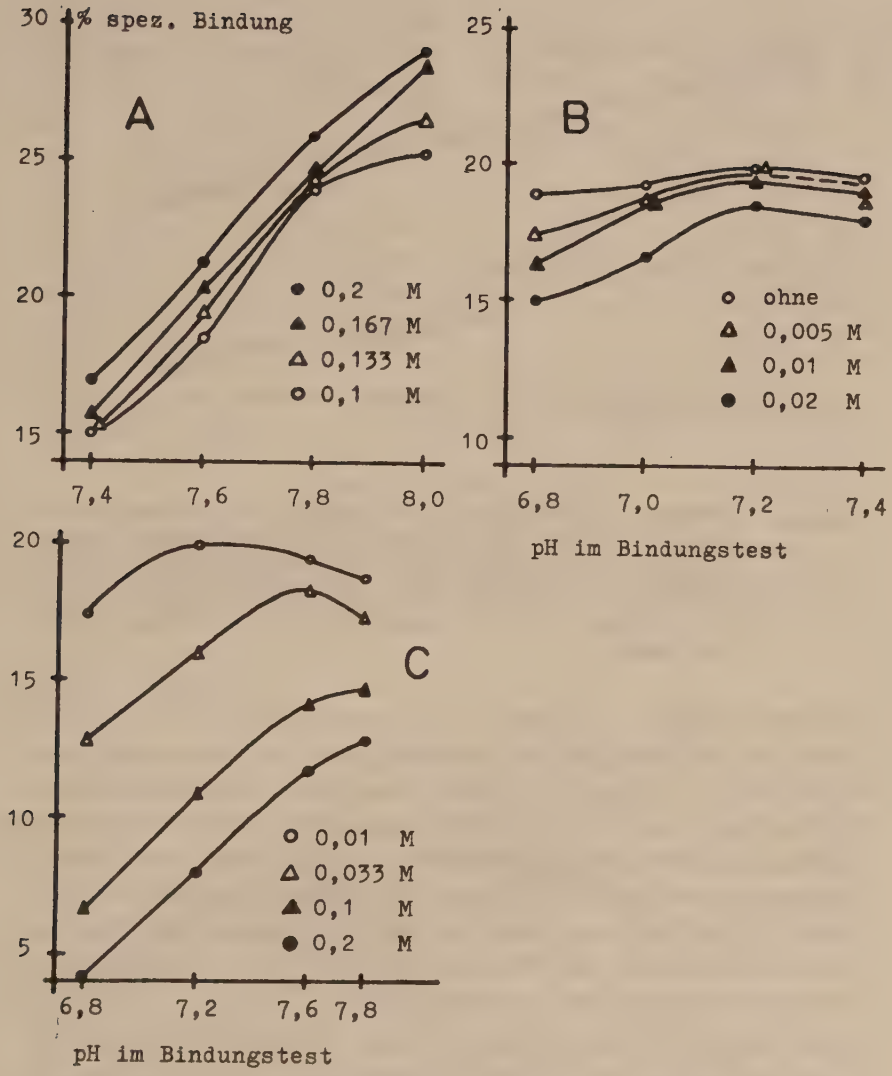


Abb. 23 pH- und Ionenstärkeabhängigkeit der spezifischen Bindung von Peak I (A) und Peak II (B,C), getestet mit KNaPP + Na-Sulfat. A: Fraktionen aus Peak I wurden vereinigt und ihre spezifische Bindung in 0,056 M KNaPP plus den angegebenen Konzentrationen an Na-Sulfat bei den angegebenen pH-Werten bestimmt. B,C: Fraktionen aus Peak II wurden vereinigt und ihre spezifische Bindung in 0,02 M KNaPP plus den angegebenen Konzentrationen an Na-Sulfat bei den angebenen pH-Werten bestimmt.

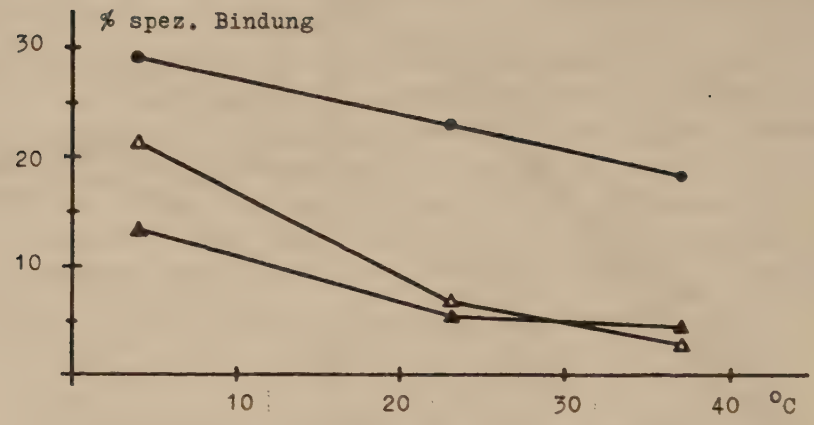


Abb. 24 Temperaturabhängigkeit der spezifischen Bindung von Peak I und Peak II. Die spezifische Bindung von Fraktionen aus Peak I in 0,056 M KNaPP pH 8,0/0,2 M Na-Sulfat (●) sowie von Fraktionen aus Peak II in 0,02 M KNaPP pH 7,2 (△) und in 0,056 M KNaPP pH 8,0/ 0,2 M Na-Sulfat (▲) wurde bei 4°C, 23°C und 37°C bestimmt.

Rezeptor-Bindung. Am stärksten reagiert Peak II, wenn er unter den Bedingungen des niederionischen Optimums inkubiert wird: bei 37°C besitzt er dann nur noch geringe Bindungsaktivität. Unter den Inkubationsbedingungen des hochionischen Optimums ist der Temperatureinfluß auf die Bindung von Peak II geringer, sodaß bei 37°C sogar eine bessere Bindung resultiert als im Fall des niederionischen Optimums. Der Einfluß der Temperatur auf die Bindung von Peak I ist relativ am schwächsten, aber auch sehr deutlich.

Diese Befunde stehen mit den in Abb. 25 und 26 gezeigten Ergebnissen zur pH- und Ionenstärkeabhängigkeit der Insulinbindung von Peak I und Peak II bei 23°C und 37°C im Einklang. Für die Untersuchungen wurde das System KNaPP/ Na_2SO_4 mit denselben pH- und Ionenstärke-Rastern wie in Abb. 23 A und C verwendet. Die Abbildungen zeigen, daß das pH- und Ionenstärke-Optimum der Bindung von Peak I auch bei höherer Tem-

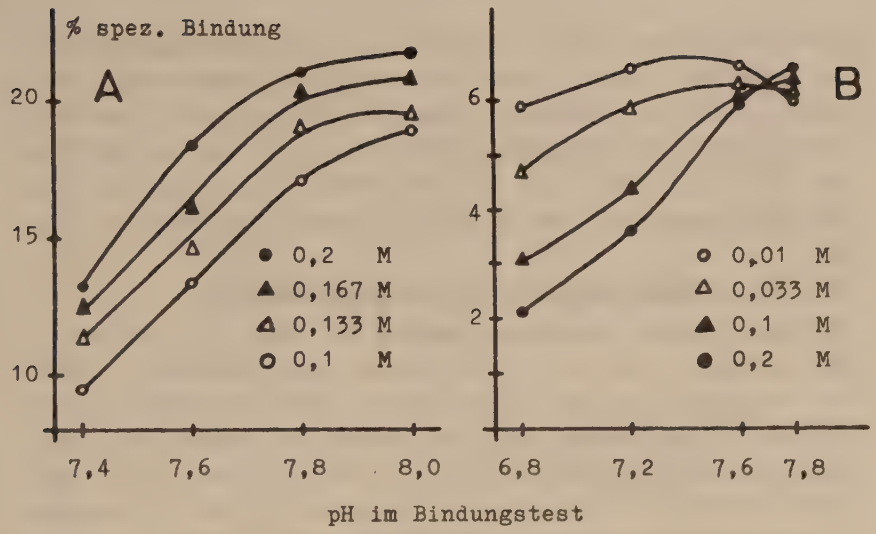


Abb. 25 pH- und Ionenstärkeabhängigkeit der spezifischen Bindung von Peak I (A) und Peak II (B) bei 23°C. Durchführung wie Abb. 23 A und C. Im Bindungstest wurde 4 Std. bei 23°C inkubiert.

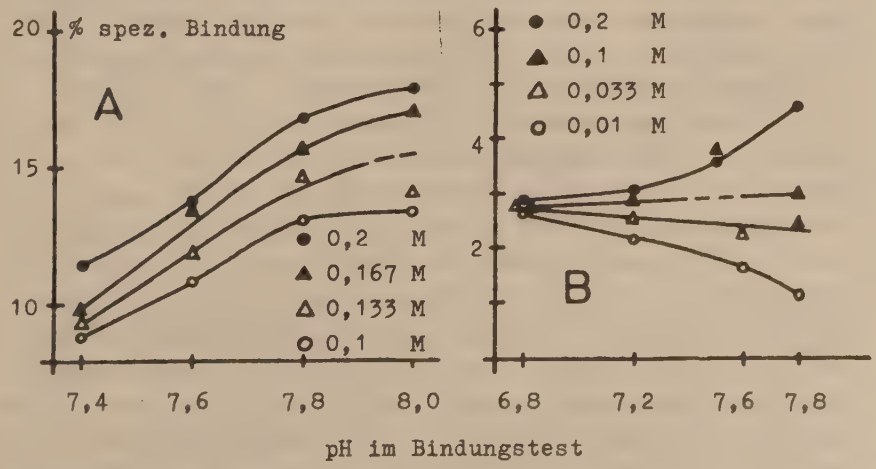


Abb. 26 pH- und Ionenstärkeabhängigkeit der spezifischen Bindung von Peak I (A) und Peak II (B) bei 37°C. Durchführung wie Abb. 23 A und C. Im Bindungstest wurde 2 Std. bei 37°C inkubiert.

peratur erhalten bleibt (Abb. 25 A, 26 A). Im Gegensatz dazu verändert sich die Form der Peak II-Diagramme wegen der überproportional starken Abnahme der Bindung beim niederionischen Optimum grundlegend (Abb. 25 B, 26 B). Man erhält so bei 37°C im Gegensatz zu 4°C für Peak I und Peak II das gleiche Bindungsoptimum bei pH 8,0 und hoher Ionenstärke.

5.7.3. Kontamination von Peak II durch Peak I ?

Das komplizierte Bindungsverhalten von Peak II bei unterschiedlichen pH-Werten, Ionenstärken und Temperaturen wirft die Frage auf, ob das hochionische Optimum von Peak II trotz der Vorsichtsmaßnahmen bei der Auswahl der Fraktionen (vgl. Zwischenbemerkung) möglicherweise nicht doch auf einer Kontamination durch Peak I beruht. Um dies zu beantworten, wurde der folgende Versuch durchgeführt. Die spezifische Bindung von 4 Fraktionen aus Peak II (Spitzenfraktion 56 sowie Fraktion 58, 59 und 60 aus dem absteigenden Ast, vgl. Abb. 17) wurde bei den vier in Abb. 27 angegebenen Inkubationsbedingungen bestimmt. Wenn keine Kontamination durch Peak I vorliegt, müssen die Zahlenverhältnisse zwischen diesen 4 Bindungswerten (A - D) für alle Fraktionen ungefähr konstant sein. Berechnet man z.B. den Quotienten Q = (A/C) : (B/D), der sich als besonders günstig erwiesen hat, für die 4 Fraktionen, so erhält man für Fraktion 58, 59 und 60 konstante Werte, nur für die Spitzenfraktion 56, die mit Sicherheit noch durch Peak I kontaminiert ist, resultiert ein höherer Wert, da der Bindungsanteil von Peak I vor allem bei 'D', kaum jedoch bei 'A', 'B' und 'C' ins Gewicht fällt. Derselbe Versuch wurde mit 3 Fraktionen aus dem absteigenden Ast eines rechromatografierten Peak II wiederholt. Die Auswertung nach derselben Formel lieferte die gleichen Werte für Q (3,45, 3,35 und 3,4) wie bei Fraktion 58 - 60 im ersten Versuch. Damit kann eine Kontamination von Peak II durch Peak I ausgeschlossen werden. Die beiden Bindungsoptima bei 4°C (niederionisches und hochionisches Optimum) sind also immanente Eigenschaften der Rezeptorspezies von Peak II.

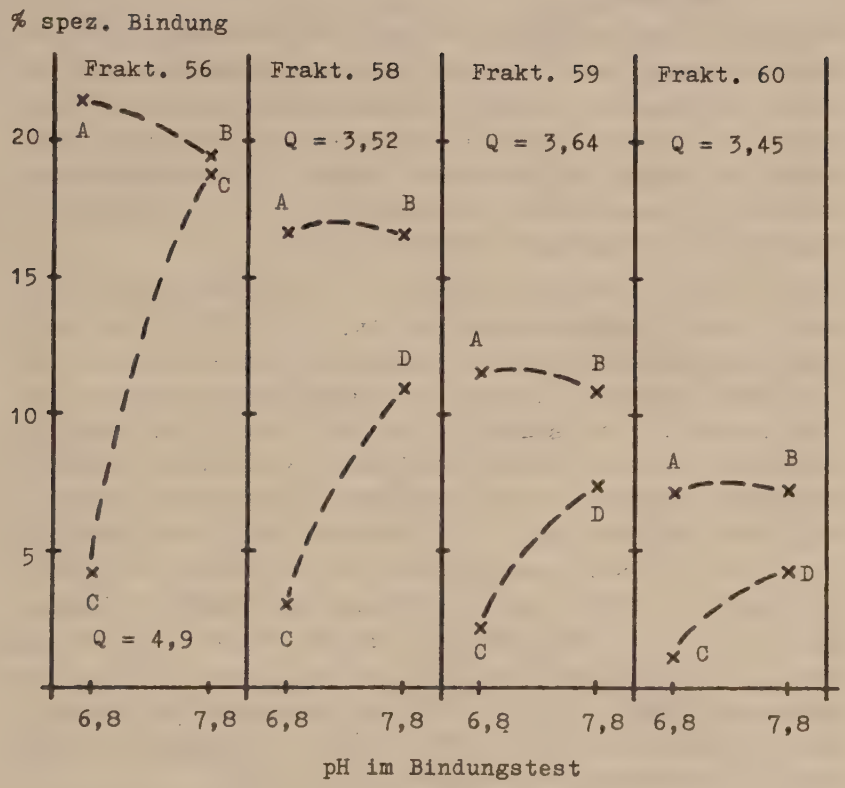


Abb. 27 Prüfung auf Kontamination von Peak II durch Peak I. Die spezifische Bindung von Fraktion 56, 58, 59 und 60 aus Peak II (Position der Fraktionen wie in Abb. 17) wurde jeweils in 0,02 M KNaPP pH 6,8 (A), 0,02 M KNaPP pH 7,8 (B), 0,02 M KNaPP pH 6,8/ 0,2 M Na-Sulfat (C),und 0,02 M KNaPP pH 7,8/ 0,2 M Na-Sulfat (D) bestimmt. Für jede Fraktion wurde der Quotient Q = (A/C) : (B/D) gebildet.

5.8. SCATCHARD-ANALYSEN DER INSULINBINDUNG VON PEAK I UND PEAK II

Nachdem im vorigen Kapitel die pH- und Ionenstärke-Optima für die Bindung von ^{125}J-Insulin an die Rezeptorspezies von Peak I und Peak II bestimmt wurden, sollen nachstehend die Bindungskonstanten unter den optimalen und einigen nicht-optimalen Bedingungen untersucht werden. Alle Versuche wurden bei 4°C durchgeführt, Bindungskonstanten bei höheren Temperaturen liegen also noch nicht vor.

Abb. 28 zeigt Scatchard-Diagramme der Insulinbindung von Peak I. Beim Bindungsversuch in Abb. 28 A wurde unter optimalen Bedingungen inkubiert, in Abb. 28 B und C war die Ionenstärke reduziert, in Abb. 28 D wurde ein niedrigerer pH-Wert verwendet. Die Kurven in Abb. 28 A und B sind bis auf den abweichenden letzten Punkt linear, in Abb. 28 C zeigt die Kurve deutliche Nichtlinearität, in Abb. 28 D besitzt sie einen leichten Knick. Die Auflösung der nichtlinearen Diagramme in 2 Bindungsanteile ergibt 2 Geraden, von denen die steile 1. Gerade den hochaffinen, die flache 2. Gerade den niederaffinen Bindungsanteil repräsentiert. Die Steigung der 1. Geraden ist am steilsten für die Bindung bei optimalen Bedingungen ($K_D = 7{,}9 \cdot 10^{-10}$ M), am flachsten bei Erniedrigung des pH-Wertes ($K_D = 1{,}75 \cdot 10^{-9}$ M). Das Umgekehrte gilt für die Steigungen der 2. Geraden.

Die verminderte ^{125}J-Insulin-Bindung von Peak I unter nicht-optimalen Inkubationsbedingungen kommt also zumindest teilweise durch eine geringere Affinität des Peak I-Rezeptors unter diesen Bedingungen zustande. Die Frage, ob auch eine verminderte Rezeptorzahl eine Rolle spielt, kann wahrscheinlich verneint werden: betrachtet man Abb. 28 C und D, so liegt die Gesamtrezeptorzahl bei 0,28 nMol/l. Obwohl die 2. Gerade in Abb. 28 A und B nicht eindeutig konstruiert werden kann, wurde dieser Wert aufgrund einer Reihe ähnlicher Versuche auch dort als Schnittpunkt der 2. Geraden angenommen (gestrichelte Linien).

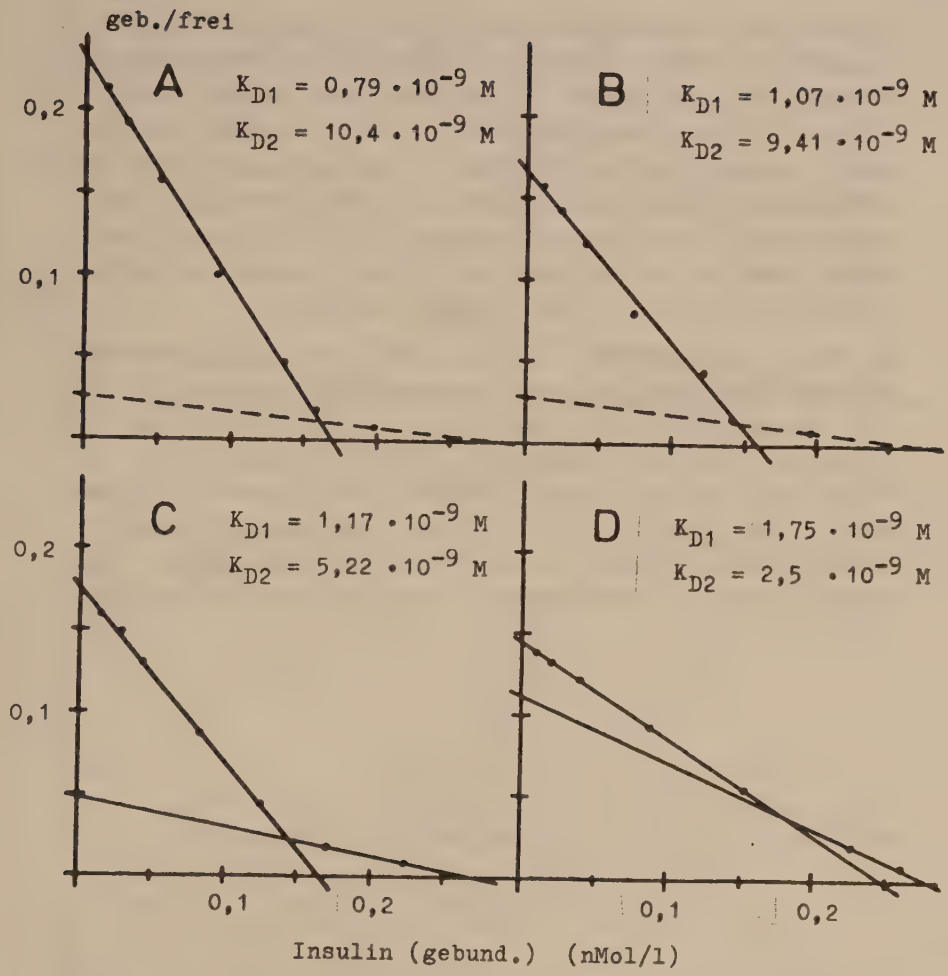


Abb. 28 Scatchard-Analyse der Insulinbindung von Peak I bei optimalen und nichtoptimalen pH- und Ionenstärkebedingungen. Fraktionen aus Peak I wurden vereinigt und ihr Bindungsverhalten in 0,056 M KNaPP pH 8,0/ 0,2 M Na-Sulfat (A), 0,12 M KNaPP pH 8,0 (B), 0,056 M KNaPP pH 8,0/ 0,033 M Na-Sulfat (C) und 0,056 M KNaPP pH 7,4/ 0,2 M Na-Sulfat (D) untersucht. Die angegebenen Dissoziationskonstanten wurden außer bei Diagramm D nach (74) ermittelt. Bei der Auswertung von Diagramm D nach (74) erhält man unsinnige Werte. In diesem Fall wurden die beiden Dissoziationskonstanten direkt aus den Steigungen der beiden Kurvenanteile berechnet.

Schließt man Kontamination durch Peak II aus, so scheint der Rezeptor von Peak I entweder verschiedene oder voneinander abhängige Bindungsstellen zu besitzen. Allerdings gibt es offenbar pH- und Ionenstärkebedingungen, bei denen fast lineare Scatchard-Kurven resultieren, was anfangs zu dem Schluß verleitete, Peak I enthalte nur eine Art unabhängiger Bindungsstellen. Eine solche Bedingung ist pH 7,4/ hohe Ionenstärke (Abb. 28 D), bei der die 1. und 2. Gerade im Scatchard-Diagramm eine fast gleiche Steigung aufweisen.

Zu ähnlichen Ergebnissen wie bei Peak I kommt man auch bei der Interpretation der Scatchard-Diagramme von Peak II (Abb. 29). Bei den Bindungsversuchen in Abb. 29 A und B wurde unter optimalen Bedingungen inkubiert (das Bindungsverhalten von Peak II ist in 0,02 M KNaPP zwischen pH 7,0 und 7,6 pH-unabhängig, vgl. Abb. 23 B, C). In Abb. 29 C wurde die Ionenstärke erhöht, in Abb. 29 D - F zusätzlich der pH-Wert verändert, wobei die Bedingungen in Abb. 29 F dem hochionischen

Abb. 29 Scatchard-Analyse der Insulinbindung von Peak II bei optimalen und nichtoptimalen pH- und Ionenstärkebedingungen. Fraktionen aus Peak II wurden vereinigt und ihr Bindungsverhalten in 0,02 M KNaPP pH 7,2 (A), 0,02 M KNaPP pH 7,63 (B), 0,1 M KNaPP pH 7,2 (C), 0,056 M KNaPP pH 7,4/ 0,2 M Na-Sulfat (D),0,056 M KNaPP pH 8,0 (E) und 0,056 M KNaPP pH 8,0/ 0,2 M Na-Sulfat (F) untersucht. Die Dissoziationskonstanten für Diagramm F wurden direkt aus den Steigungen der beiden Kurvenanteile, die anderen nach (74) bestimmt.

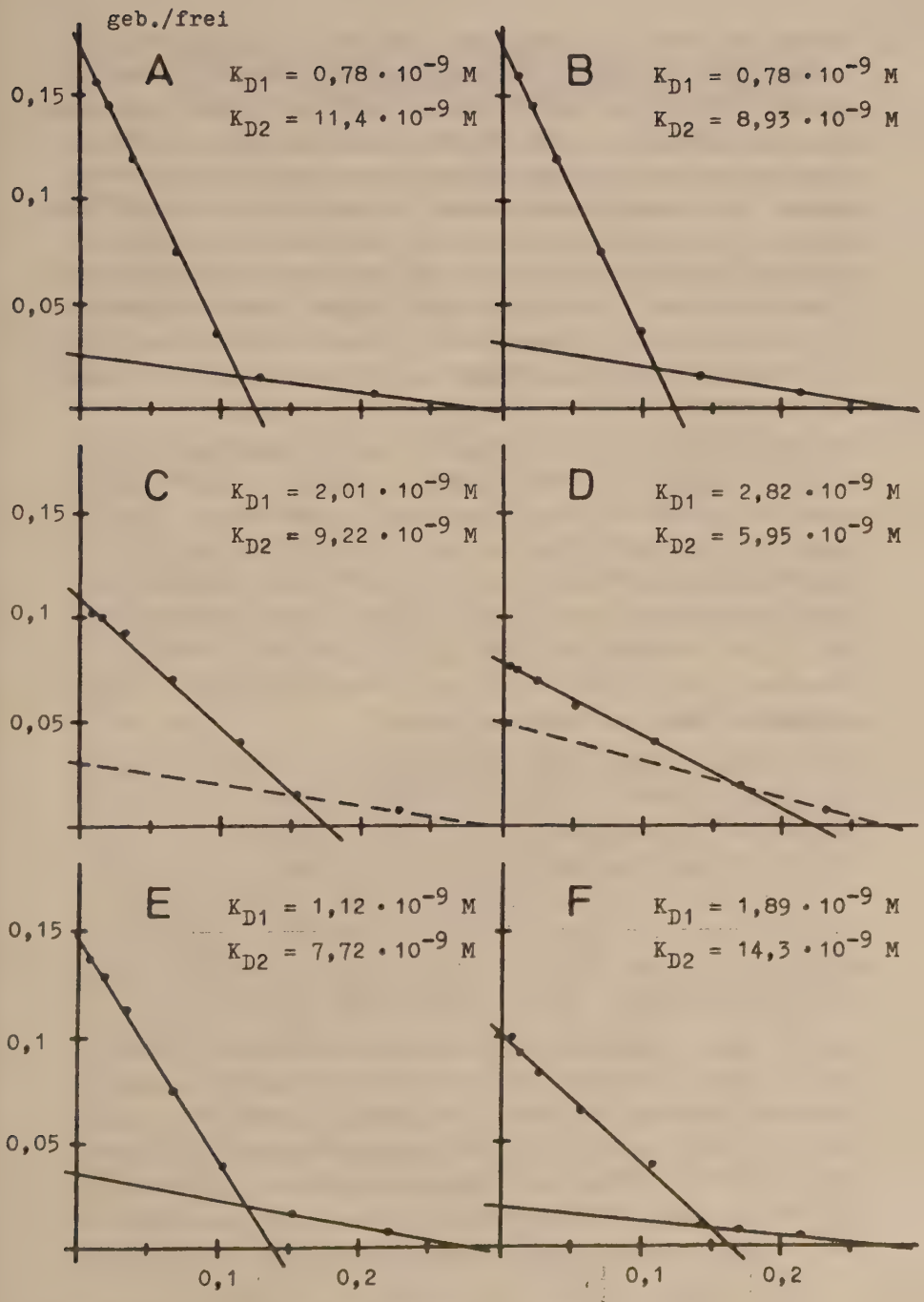

geb./frei
A
K_{D1} = 0,78 • 10^{-9} M
K_{D2} = 11,4 • 10^{-9} M
B
K_{D1} = 0,78 • 10^{-9} M
K_{D2} = 8,93 • 10^{-9} M
C
K_{D1} = 2,01 • 10^{-9} M
K_{D2} = 9,22 • 10^{-9} M
D
K_{D1} = 2,82 • 10^{-9} M
K_{D2} = 5,95 • 10^{-9} M
E
K_{D1} = 1,12 • 10^{-9} M
K_{D2} = 7,72 • 10^{-9} M
F
K_{D1} = 1,89 • 10^{-9} M
K_{D2} = 14,3 • 10^{-9} M
0,15
0,1
0,05
0,1
0,2
Insulin (gebund.) (nMol/l)

Abb. 29

Optimum von Peak II entsprechen. Bis auf die Scatchard-Kurve in Abb. 29 D, die nur einen leichten Knick besitzt, sind alle Scatchard-Diagramme deutlich nichtlinear und lassen sich ebenfalls wieder in 2 Geraden auflösen. Auch bei Peak II ist die 1. Gerade am steilsten bei Inkubation unter optimalen Bedingungen, d.h. beim niederionischen Optimum ($K_D = 7{,}8 \cdot 10^{-10}$ M). Für das hochionische Optimum erhält man dagegen nur $K_D = 1{,}89 \cdot 10^{-9}$ M (dieser Wert ist somit erheblich grösser als der K_D-Wert von Peak I unter denselben Inkubationsbedingungen, vgl. Abb 28 A). Die Steigung der 2. Geraden scheint bei Peak II weniger abhängig vom pH-Wert und der Ionenstärke zu sein als bei Peak I.

Die schwächere Bindung von Peak II bei nichtoptimalen Inkubationsbedingungen ist also wiederum eine Folge der verringerten Affinität des Peak II-Rezeptors unter diesen Bedingungen. Eine Verminderung der Rezeptorzahl als zweite Ursache kann wie bei Peak I ebenfalls mit hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden, da alle Scatchard-Kurven in Abb. 29 die Abszisse ungefähr im selben Punkt (0,28 nMol/l) schneiden (auch für Abb. 29 C und D wurde dieser Schnittpunkt angenommen, vgl. gestrichelte Linien).

Wie bei Peak I deuten auch bei Peak II die nichtlinearen Scatchard-Diagramme auf negative Kooperativität oder Heterogenität der Bindungsstellen des Peak II-Rezeptors hin. Bei pH 7,4 und hoher Ionenstärke findet man jedoch wie in Abb. 28 D ebenfalls eine 'Linearisierung' der Scatchard-Kurve. Die Steigungen der beiden Geraden nähern sich einander an, gelegentlich wurden unter diesen Bedingungen für beide Peaks sogar völlig lineare Scatchard-Diagramme erhalten.

Um sicher auszuschließen, daß die gefundenen Scatchard-Kurven für Peak I und Peak II durch Kontamination des einen durch den anderen Peak verfälscht waren, wurden verschiedene Bindungsversuche auch mit rechromatografiertem Peak I und Peak II durchgeführt. Die Ergebnisse stimmten in allen Fällen mit den hier dargestellten überein.

5.9. MOLEKULARGEWICHTSBESTIMMUNG VON PEAK I, PEAK II UND DEM INSULIN-ABBAUPEAK MITTELS GELFILTRATION

Die Molekulargewichte von Peak I, Peak II und dem Abbaupeak aus Membranextrakt wurden mittels Gelfiltration an Sepharose 4B CL und Sepharose 6B CL bestimmt (Abb. 30 und 31). Zusätzlich wurde auch die Größe des bei der Gelfiltration von Membranextrakt auftretenden 'Tritonpeaks' (vgl. Abb. 17) mitbestimmt. Für Peak I erhält man einen Stokes'Radius von ca. 91 Å und ein Molekulargewicht um 800.000, für Peak II ca. 79 Å und MG 610.000, für den Abbaupeak ca. 46 Å und MG 130.000. Die Übereinstimmung zwischen den beiden Trenngelen ist für diese drei Peaks relativ gut. Die Unterschiede bei Peak I beruhen vermutlich darauf, daß die Bestimmung in Abb. 30 mit Membranextrakt, in Abb. 31 dagegen mit Peak I-Fraktionen durchgeführt wurde. Bei Verwendung von Membranextrakt scheint die Lage des Peak I-Maximums im Eluat wegen der Überlappung mit Peak II etwas nach links verschoben zu sein. Der Grund für die unterschiedlichen Resultate für den 'Tritonpeak' in Abb. 30 und 31 ist unbekannt.

Allerdings muß das Ergebnis einer Molekulargewichtsbestimmung mittels Gelfiltration, dazu noch von Membranproteinen in Anwesenheit eines Detergens, grundsätzlich mit Vorsicht betrachtet werden. Das Hauptproblem dabei ist die Anlagerung von Triton an die Membranproteine (16,96), die bis zum Doppelten des Proteingewichts ausmachen kann und eine erhebliche Überschätzung des Stokes'Radius und des Molekulargewichts zur Folge hat. Als weiteres Problem kann bei großen asymmetrischen Molekülen eine Retardierung bei der Elution durch Einwanderung der Molekülenden in die Gelporen auftreten (111). Weiterhin erhält man wegen Heterogenität der Porengrößen bei Sepharose-Gelen oft nicht die von der Theorie geforderte lineare Beziehung zwischen Stokes'Radius und der betreffenden Funktion von K_{av} (96). Außerdem ist K_{av}, wie in 5.5. schon kurz erwähnt, abhängig vom pH und der Ionenstärke des Elutionspuffers, vermutlich aufgrund der Anwesenheit geringer Mengen an Sulfatgruppen im Sepharose-Gel (96).

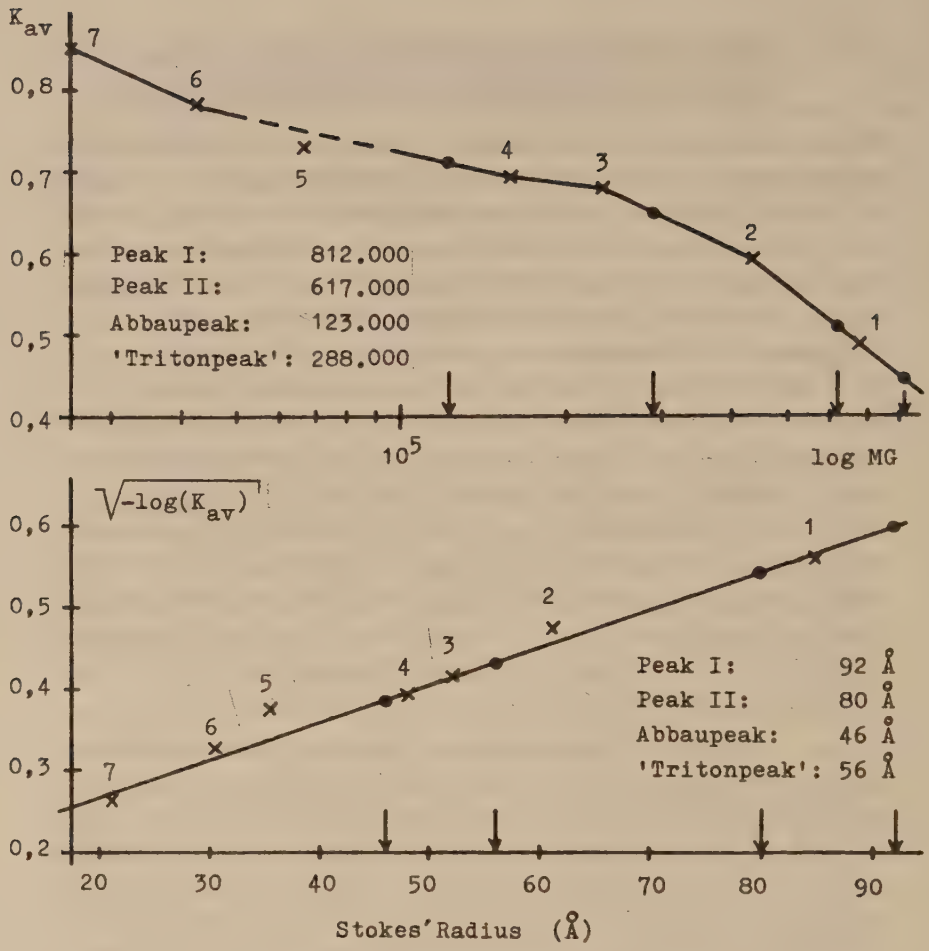


Abb. 30 Molekulargewichtsbestimmung von Peak I, Peak II und dem Abbaupeak aus Membranextrakt an Sepharose 4B CL (Säule 2,7 × 120 cm). Durchführung der Säulenläufe und Aufstellung der Eichkurve: vgl. 4.7.2. Standardproteine: 1 = Thyroglobulin, 2 = Ferritin, 3 = Katalase, 4 = Aldolase, 5 = Albumin, 6 = Ovalbumin, 7 = Chymotrypsinogen. Bestimmung der Elutionsvolumina von Peak I, Peak II, Abbaupeak und 'Tritonpeak': 3,5 ml 0,5% Extrakt wurden auf die Säule aufgetragen und im Eluat die spezifische Bindung in 0,067 M KNaPP pH 7,7/ 0,067 M NaCl (Peak I) und 0,05 M KNaPP pH 6,8/ 0,067 M NaCl (Peak II) sowie der Insulinabbau und die Extinktion bei 274 nm bestimmt. Oberes Diagramm: Ermittlung der Molekulargewichte. Unteres Diagramm: Ermittlung der Stokes' Radien.

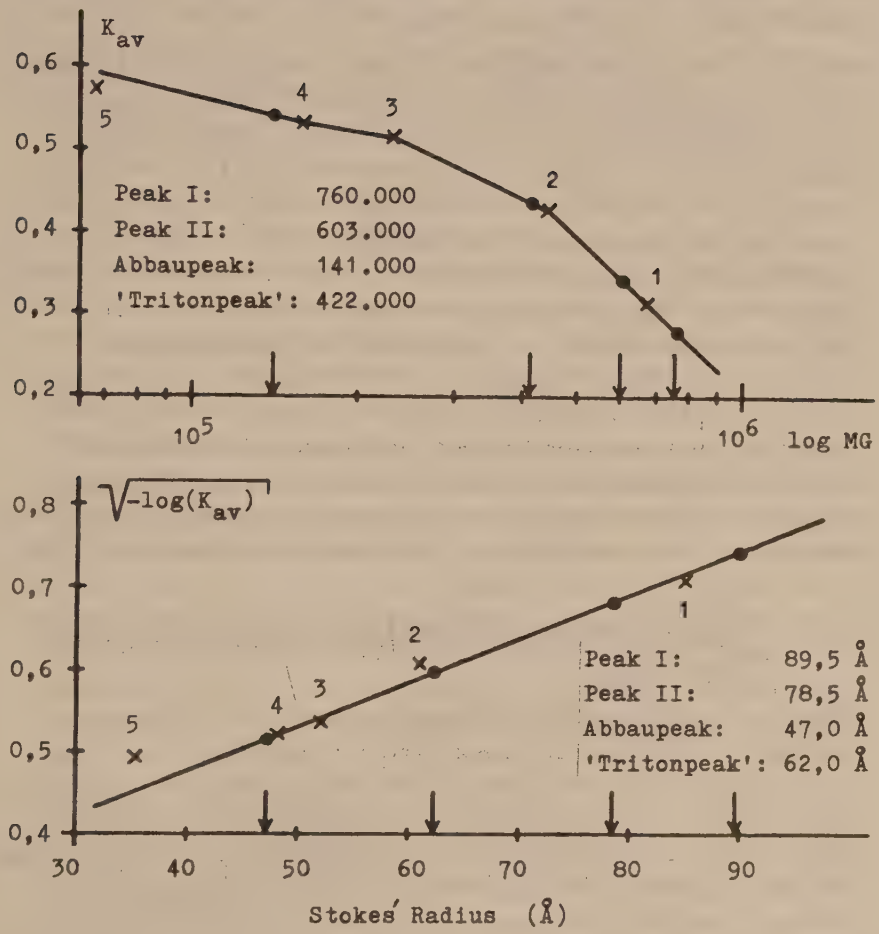


Abb. 31 Molekulargewichtsbestimmung an Sepharose 6B CL (Säule 2,7 × 125 cm). Durchführung wie in Abb. 30. Zur Bestimmung der Elutionsvolumina von Peak I und Peak II wurden hier jedoch Peak I bzw. Peak II-Fraktionen einer Gelfiltration von Membranextrakt jeweils vereinigt, lyophilisiert und in wenig Volumen gelöst auf die Säule aufgetragen. Die spezifische Bindung im Eluat wurde wie in Abb. 30 bestimmt.

Eine korrekte Bestimmung des Molekulargewichts und des Stokes'Radius ist daher nur in Verbindung mit anderen Methoden, z.B. Sedimentationsanalyse, möglich.

Bei den verwendeten Standardproteinen traten folgende Besonderheiten auf: Thyroglobulin von Pharmacia zeigte einen Vorpeak, Thyroglobulin von Serva besaß sogar neben dem Hauptpeak noch zwei relativ große Nebenpeaks. Ferritin von Pharmacia zeigte ebenfalls einen Vorpeak, es sollte nur mit Vorsicht zur Molekulargewichtsbestimmung verwendet werden (96). Aldolase (Pharmacia und Boehringer) ergab selbst beim Auftragen großer Mengen nur einen sehr kleinen Elutionspeak, das Protein scheint unter den gewählten Elutionsbedingungen zu denaturieren. Albumin lag wegen der Anlagerung von Triton (96) neben den Standardprotein-Kurven. Noch stärker traf dies für das Albumin-Dimere zu, das deshalb als Standard nicht mitverwendet werden konnte. Thyroglobulin, Katalase, Aldolase und Ovalbumin binden dagegen nach (60,96) kein Triton und eignen sich daher gut als Standardproteine.

5.10. GELFILTRATION VON PHOTOAFFINITÄTSMARKIERTEM PEAK I UND PEAK II

Mit Hilfe der Photoaffinitätsmarkierung der Rezeptorspezies von Peak I und Peak II lassen sich die Ergebnisse der bisherigen Gelfiltrationen noch einmal überprüfen. Abb. 32 zeigt Säulenläufe von photoaffinitätsmarkiertem Peak I und Peak II. Fraktionen beider Peaks wurden dazu jeweils bei den optimalen pH- und Ionenstärkebedingungen mit ^{125}J-MABI inkubiert und photolysiert. Dabei wurden alle Inkubationen zur Feststellung spezifischer Markierung mit und ohne natives Insulin im Inkubationsansatz durchgeführt. Die Abbildung zeigt, daß die markierten Peak I- und Peak II-Fraktionen wieder als symmetrische Peaks eluiert werden, die Peak I-Fraktion etwas früher als die Peak II-Fraktionen. Die Peak II-Fraktionen werden unabhängig von den beiden Inkubations- und Photolysebedingungen (niederionisches oder hochionisches Optimum) in derselben Position eluiert (Abb. 32 B,C). Die Rezeptorspezies

von Peak II ändert also unter den verschiedenen pH- und Ionenstärkebedingungen ihre Größe nicht. Die Elutionspositionen der markierten Peak I- und Peak II-Fraktionen stimmen dabei genau mit den Positionen überein, die man für Peak I und Peak II erhält, wenn man an derselben Säule unter Verwendung des gleichen Elutionspuffers Membranextrakt auftrennt und die Bindung im Eluat bestimmt (nicht gezeigt).

Zwischen markiertem Rezeptorpeak und ^{125}J-MABI-Peak zeigen Abb. 32 A - C einen weiteren spezifisch markierten Bereich zwischen Fraktion 100 - 120 sowie einen unspezifisch markierten Peak bei Fraktion 110. Der unspezifisch markierte Peak stammt, wie Abb. 32 D zeigt, aus dem verwendeten ^{125}J-MABI. Es handelt sich dabei um Reaktionsprodukte von ^{125}J-MABI und Albumin, das bei der ^{125}J-MABI-Präparation als Autoradiolyseschutz zugesetzt wurde (vgl. 4.2.1.). Bei Verwendung einer albuminfreien ^{125}J-MABI-Präparation fehlt dieser unspezifische Zwischenpeak. Auch bei der spezifischen Markierung zwischen Fraktion 100 - 120 handelt es sich nicht um spezifisch markierte Rezeptor-Untereinheiten o.ä., sondern offensichtlich um ein Artefakt, das aus unbekanntem Grund auch nur bei Verwendung albuminhaltiger ^{125}J-MABI-Präparationen auftritt. Als spezifisch markierte Peaks erhält man in Abb. 32 A - C also nur die symmetrischen Peaks I und II.

Mit Hilfe der Photoaffinitätsmarkierung ist es möglich, über Gelfiltration Bruchstücke des Insulinrezeptors nachzuweisen, die z.B. bei Reduktion oder enzymatischer Behandlung entstehen und die selbst kein ^{125}J-Insulin mehr binden. Abb. 32 E zeigt dazu einen Vorversuch: photoaffinitätsmarkierter Peak I wurde mit DTE (30 mM) 1 Std. bei 4°C reduziert und gelfiltriert. Man sieht, daß bei Fraktion 90 noch ein spezifisch markierter Anteil auftritt, dessen Identität allerdings unklar ist. Kleinere Bruckstücke des Peak I-Rezeptors sind im Elutionsdiagramm jedoch nicht identifizierbar. Mit reduziertem Peak II wurde ein ähnliches Resultat erhalten.

Die Identifizierung kleinerer Rezeptorbruchstücke wird dadurch erschwert, daß unter dem Einfluß von DTE (besonders in

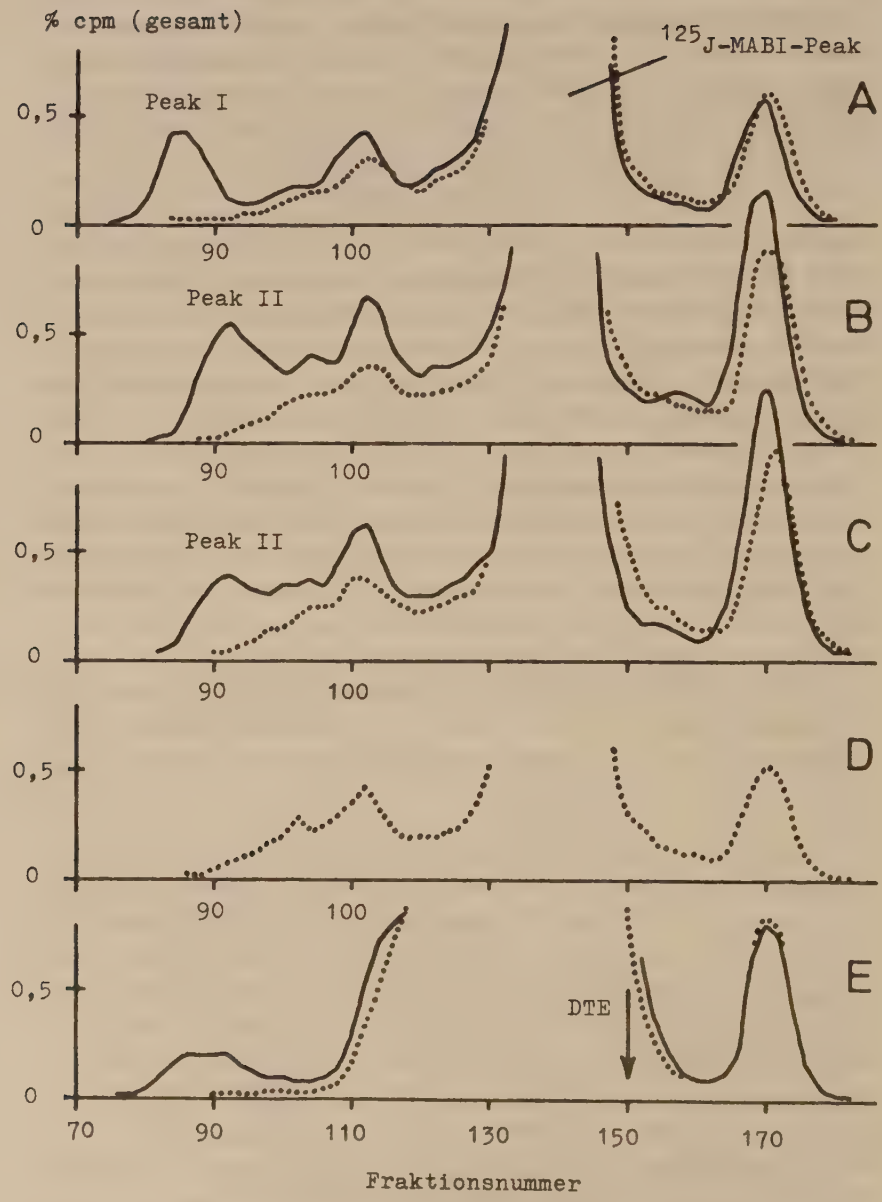

% cpm (gesamt)
Peak I
125J-MABI-Peak
A
Peak II
B
Peak II
C
D
DTE
E
0,5
0
90
100
70
110
130
150
170
Fraktionsnummer

Abb. 32

der verwendeten hohen Konzentration) höhermolekulare Aggregationsprodukte aus ^{125}J-MABI, dessen A- und B-Kette sowie weiteren SH-Funktionen entstehen, die zu einer breiten Schulter vor dem ^{125}J-MABI-Peak führen. Kleinere spezifische Peaks werden dadurch verdeckt. Dazu kommt außerdem, daß die photoreaktive Gruppe des ^{125}J-MABI sich an Lys^{B29} befindet, das ^{125}J jedoch zu 80 - 90% an Tyr^{A19} lokalisiert ist (34). Da bei der Reduktion A- und B-Kette des ^{125}J-MABI voneinander getrennt werden, besitzen die markierten Rezeptorbruchstücke nur mehr 10 - 20% der ursprünglichen Radioaktivität, was ihren Nachweis zusätzlich erschwert.

5.11. SDS-PAGE VON PEAK I UND PEAK II

5.11.1. SDS-PAGE an Rundgelen

Außer über Gelfiltration wurden die photoaffinitätsmarkierten Rezeptorspezies von Peak I und Peak II auch mittels SDS-PAGE untersucht. Abb. 33 zeigt die Ergebnisse von Rundgel-Elektrophoresen (diskontinuierliches System nach Laemmli), die mit verschiedenen Fraktionen eines Sepharose 4B CL-Säulenlaufs nach Photoaffinitätsmarkierung mit und ohne anschließende Reduktion durchgeführt wurden (Fraktionen 50, 52, 54, 56 und 58, vgl. Abb. 17). Alle Fraktionen wurden dazu

Abb. 32 Gelfiltration von photoaffinitätsmarkiertem Peak I und Peak II. A: Jeweils 1,5 ml einer Fraktion aus Peak I wurden mit 125J-MABI (2 Mio. cpm) allein (————) und in Anwesenheit von nativem Insulin (30 µg/ml) (·····) 24 Std. bei 4°C in 0,056 M KNaPP pH 8,0/ 0,2 M Na-Sulfat inkubiert, photolysiert und an einer Sepharose 6B CL-Säule (1,4 × 120 cm) aufgetrennt (vgl. 4.7.3.). Die Fraktionen wurden im Gammazähler gezählt. B,C: in derselben Weise wurden Fraktionen aus Peak II in 0,02 M KNaPP pH 7,2 (B) und 0,056 M KNaPP pH 8,0/ 0,2 M Na-Sulfat (C) inkubiert, photolysiert und gelfiltriert. D: 125J-MABI (2 Mio. cpm) wurde in 1,5 ml 0,04 M KNaPP pH 7,4/ 0,08% Triton 24 Std. bei 4°C inkubiert, photolysiert und gelfiltriert. E: Inkubation wie unter A beschrieben. Nach der Photolyse wurden die beiden Inkubationsansätze mit 30 mM DTE reduziert (1 Std., 4°C) und gelfiltriert.

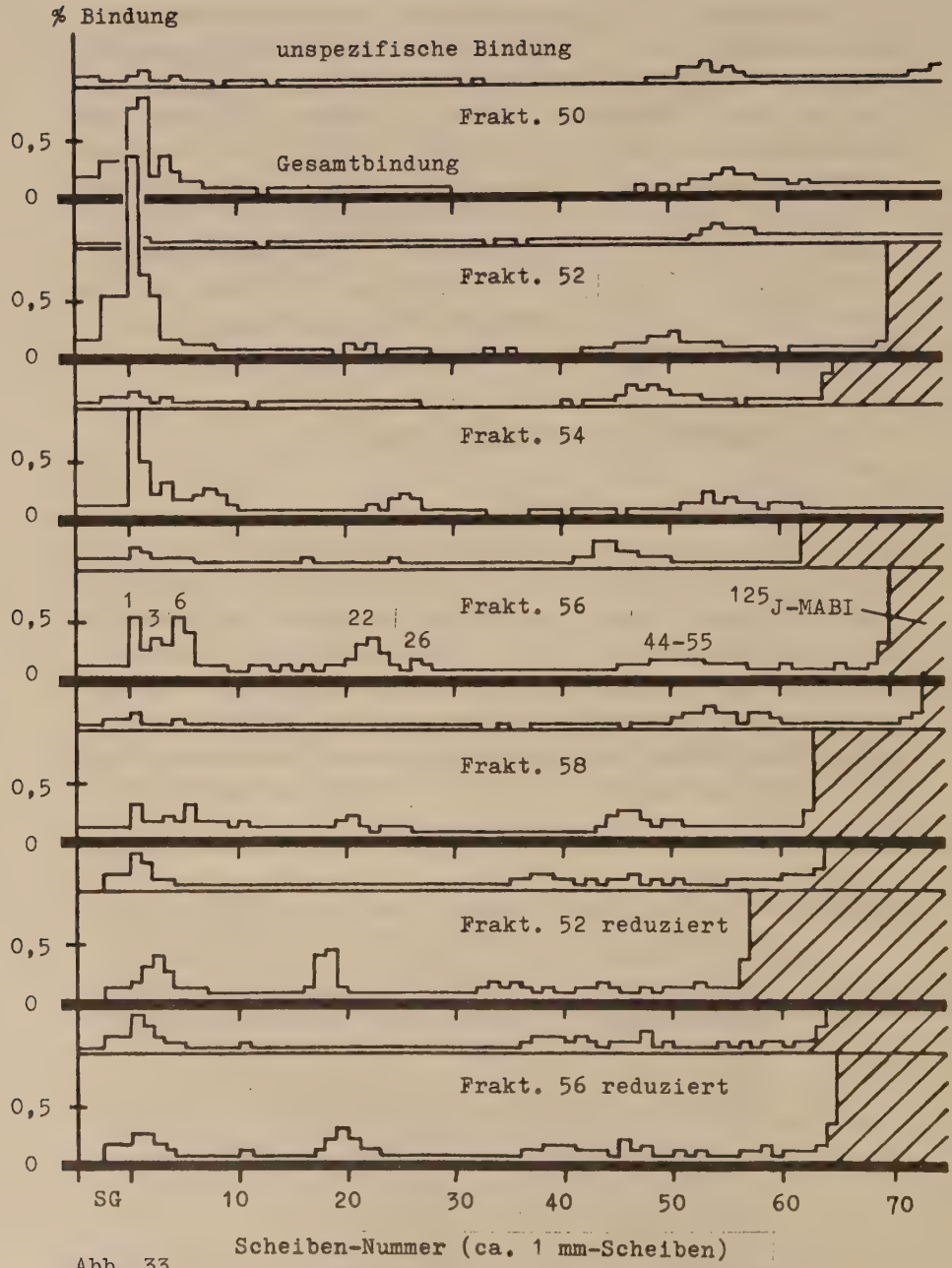

% Bindung
unspezifische Bindung
Frakt. 50
Gesamtbindung
Frakt. 52
Frakt. 54
Frakt. 56
125J-MABI
1
3
6
22
26
44-55
Frakt. 58
Frakt. 52 reduziert
Frakt. 56 reduziert
0,5
0
SG
10
20
30
40
50
60
70
Scheiben-Nummer (ca. 1 mm-Scheiben)

Abb. 33

bei den gleichen pH- und Ionenstärkebedingungen (0,1 M KNaPP pH 7,6) mit ^{125}J-MABI inkubiert und photolysiert. Ohne Reduktion beobachtet man für die Fraktionen aus Peak I (Spitzenfraktion 52) eine starke Bande bei ca. 1 mm, die z.T. noch ins Sammelgel hineinreicht, sowie eine schwächere bei ca. 3 mm. Für die Peak II-Fraktionen (Spitzenfraktion 56) treten neue Banden bei 6 mm, 22 mm und 26 mm auf, während die Banden bei 1 mm und 3 mm zurücktreten. Nach Reduktion liefern alle Fraktionen nur noch eine spezifische Bande bei 22 mm. Unspezifische Banden liegen im Bereich von 45 - 55 mm (Reaktionsprodukte von ^{125}J-MABI und Albumin) sowie bei den reduzierten Proben am Anfang des Trenngels (durch DTE verursachte hochmolekulare Aggregationsprodukte).

Die Methode des Schneidens von Rundgelen erlaubt nur eine verhältnismäßig ungenaue Auswertung der Lage der radioaktiven Banden. Alle weiteren Versuche wurden daher mit Flachgelen durchgeführt, die anschließend autoradiografiert wurden, wobei zwei verschiedene Trennsysteme, das diskontinuierliche System nach Laemmli und ein kontinuierliches System nach Fairbanks, Verwendung fanden.

Abb. 33 SDS-PAGE an Rundgelen von photoaffinitätsmarkierten Fraktionen aus Peak I und Peak II. Jeweils 400 µl der Fraktionen 50, 52, 54, 56 und 58 (Position der Fraktionen wie in Abb. 17) wurden mit 125J-MABI (2 Mio. cpm) allein (unteres Bindungsprofil) und in Anwesenheit von nativem Insulin (30 µg/ml) (oberes Bindungsprofil) 23 Std. bei 4°C in 0,1 M KNaPP pH 7,6 inkubiert und photolysiert. Die Inkubationsansätze wurden geteilt und die eine Hälfte mit 30 mM DTE 5 min. bei 100°C reduziert. Von jedem Ansatz wurden 100 µl aufgetragen. Nach der Elektrophorese (Laemmli-System, vgl. 4.11.1.) wurden die Rundgele geschnitten und die Scheiben im Gammazähler gezählt. Die unterschiedliche Anzahl der Scheiben pro Rundgel kommt vor allem durch verschiedene Scheibendicke, weniger durch ungleiche Länge der Rundgele zustande. Von den reduzierten Proben werden nur Fraktion 52 und 56 gezeigt. SG = Sammelgel.

5.11.2. SDS-PAGE an Flachgelen

Die Abbildungen 34 und 35 stellen Autoradiogramme von Flachgelen nach Laemmli und Fairbanks in zeichnerischer Wiedergabe dar. Abb. 36 zeigt zur besseren Anschauung auch verschiedene Ausschnitte fotografierter Autoradiogramme. Für die Elektrophorese-Versuche wurden Fraktionen aus Peak I und Peak II unter ihren jeweils optimalen Bedingungen mit ^{125}J-MABI inkubiert und photolysiert, wobei die Inkubationen jeweils ohne und mit nativem Insulin erfolgten. Die Proben wurden vor der Elektrophorese entweder nicht reduziert oder in zunehmender Stärke mit 0,1 - 10 mM Mercaptoäthanol oder 80 mM DTE reduziert. Zwischen der Reduktion mit 10 mM Mercaptoäthanol und 80 mM DTE bestand kein Unterschied mehr, die Reduktion war in beiden Fällen vollständig. In Abb. 34 und 35 sind die Bandenmuster der nichtreduzierten, der mit 80 mM DTE völlig reduzierten und der mit 0,5 mM Mercaptoäthanol schwach reduzierten Proben wiedergegeben, die einen Übergangszustand darstellen. Da alle Proben, die während der Inkubation natives Insulin enthielten, außer der ^{125}J-MABI-Bande keinerlei Banden auf den Autoradiogrammen zeigten (vgl. Abb. 36), wurden diese in Abb. 34 und 35 weggelassen. Alle dort gezeichneten Banden sind also spezifische Rezeptorbanden. Eine unspezifische 'Albumin'-Bande wie in Abb. 33 tritt nicht auf, da für diese Versuche eine albuminfreie ^{125}J-MABI-Präparation verwendet wurde.

Betrachtet man Abb. 34 im einzelnen, so findet man für den nichtreduzierten Peak I sechs Banden (Abb. 34 A): zwei Hauptbanden hohen Molekulargewichts (2 und 4), zwei stärkere Nebenbanden (1 und 3), von denen Bande 1 entweder so hochmolekular ist, daß sie nicht ins Trenngel einwandert, oder eine Aggregation auf der Geloberfläche darstellt, und zwei sehr schwache Nebenbanden (5 und 7) von geringerem Molekulargewicht. Von diesen ist Bande 7 identisch mit der starken Bande, die man bei Reduktion von Peak I erhält. Die unterschiedliche Lage von Bande 7 (wie auch aller anderen Banden) bei der reduzierten und nichtreduzierten Probe hängt nach (38,103)

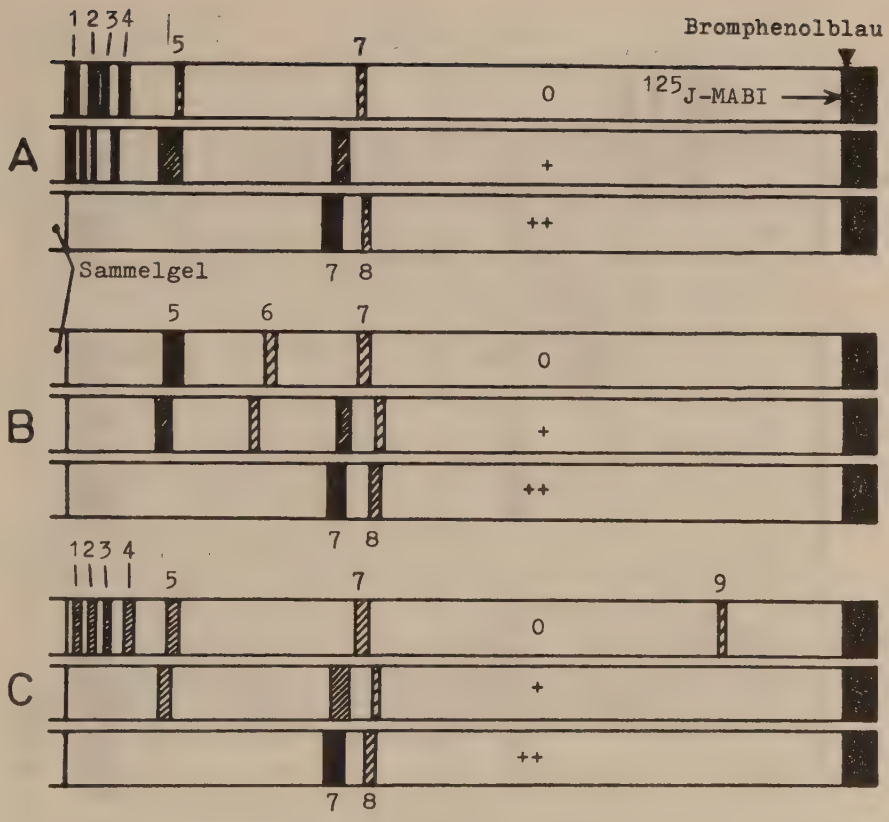


Abb. 34 Autoradiogramme von Laemmli-SDS-Polyacrylamidgelen von photoaffinitätsmarkiertem Peak I und Peak II. A: Jeweils 1 ml einer Fraktion aus Peak I wurde mit 125J-MABI (3 Mio. cpm) allein und in Anwesenheit von nativem Insulin (30 µg/ml) 28 Std. bei 4°C in 0,1 M KNaPP pH 8,0 inkubiert und photolysiert. Entsprechend wurde Peak II in 0,01 M KNaPP pH 7,0 (B) und 0,1 M KNaPP pH 8,0 (C) photoaffinitätsmarkiert. Die Inkubationsansätze wurden anschließend zu je einem Drittel nicht reduziert (0), mit 0,5 mM Mercaptoäthanol schwach reduziert (+) und mit 80 mM DTE stark reduziert (++). Von jedem Ansatz wurden 25 µl aufgetragen und an Flachgelen nach Laemmli elektrophoretisiert. Nach der Elektrophorese wurden die Gele getrocknet und autoradiografiert. Die Zahlen entsprechen den Banden-Nummern. Es sind nur die Autoradiogramme der Proben ohne natives Insulin wiedergegeben.

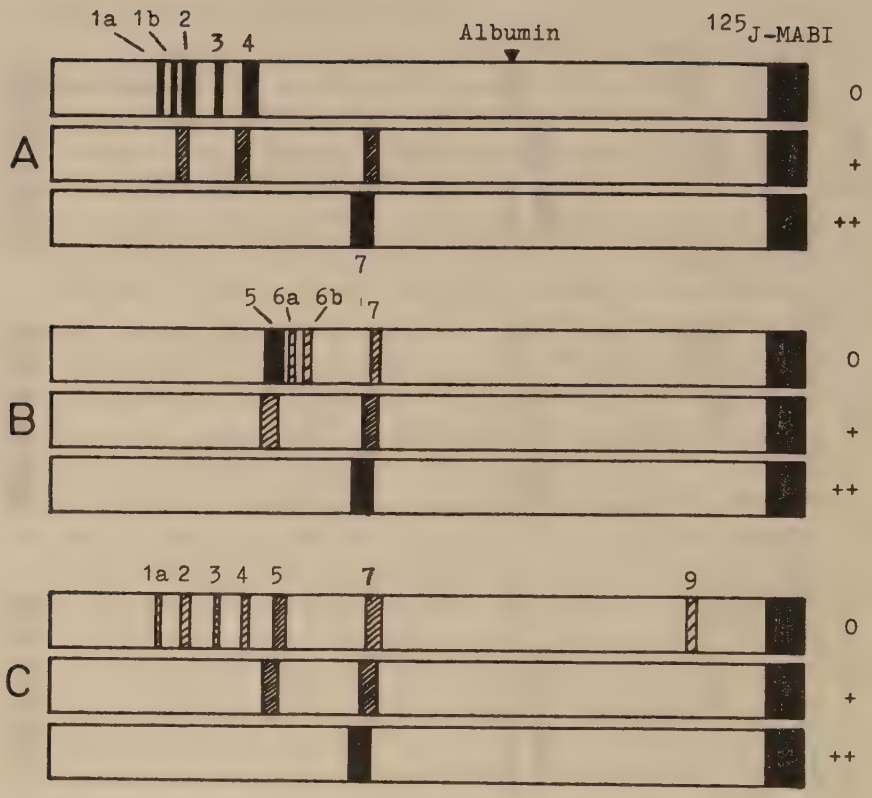


Abb. 35 Autoradiogramme von Fairbanks-SDS-Polyacrylamidgelen von photoaffinitätsmarkiertem Peak I und Peak II. Durchführung und Erläuterungen wie in Abb. 34. Die Elektrophorese erfolgte an Flachgelen nach Fairbanks.

mit der Anwesenheit intramolekularer Disulfidbrücken zusammen, die im nichtreduzierten Fall eine kompaktere Form und damit eine schnellere Wanderungsgeschwindigkeit bewirken. Zusätzlich zu Bande 7 tritt bei der vollständigen Reduktion von Peak I noch eine sehr schwache Bande 8 von etwas kleinerem Molekulargewicht auf. Bei schwacher Reduktion von Peak I treten die hochmolekularen Banden zurück und es zeigt sich verstärkt Bande 5, die offenbar einen Zwischenzustand auf dem Weg zur völligen Reduktion darstellt.

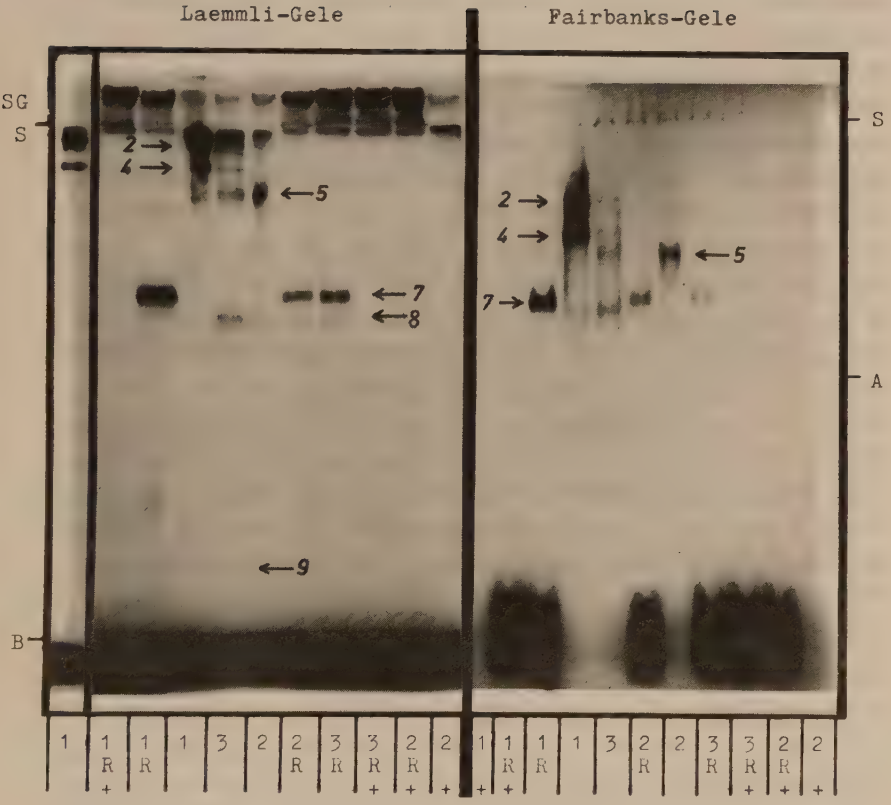


Abb. 36 Autoradiogramme von SDS-Polyacrylamidgelen nach Laemmli und Fairbanks von photoaffinitätsmarkiertem Peak I und Peak II. Durchführung wie in Abb. 34 und 35. Aufgetragene Proben: 1 = Peak I, photoaffinitätsmarkiert in 0,1 M KNaPP pH 8,0; 2 = Peak II, photoaffinitätsmarkiert in 0,01 M KNaPP pH 7,0; 3 = Peak II, photoaffinitätsmarkiert in 0,1 M KNaPP pH 8,0; R = Probe mit 80 mM DTE reduziert; + = Probe photoaffinitätsmarkiert in Anwesenheit von nativem Insulin (30 µg/ml). S = Start, B = Bromphenolblau-Bande, A = Albuminbande, SG = Sammelgel. Die Zahlen auf den Autoradiogrammen entsprechen den Bandennummern.

Bei Peak II (inkubiert beim niederionischen Optimum) findet man ohne Reduktion drei Banden (Abb. 34 B): eine starke Hauptbande (gleiche Position wie Bande 5 von Peak I) und zwei schwache Nebenbanden (6 und 7), von denen Bande 6 neu ist. Wie bei Peak I entsteht Bande 7 auch bei Peak II als Hauptbande nach völliger Reduktion, wiederum zusammen mit Bande 8, die hier deutlicher als bei Peak I erscheint. Bei partieller Reduktion nimmt Bande 7 auf Kosten von Bande 5 zu. Die hochmolekularen Banden 1 - 4 fehlen bei Peak II unter den Bedingungen des niederionischen Optimums völlig. Diese Banden treten jedoch wieder auf, wenn Peak II unter den Bedingungen des hochionischen Optimums inkubiert wird (Abb. 34 C), allerdings sind sie schwächer als bei Peak I. Dafür treten die Banden 5 und 7 verglichen mit Peak I stärker hervor, Bande 7 ist hier erstmals auch bei Nicht-Reduktion deutlich ausgeprägt. Zusätzlich tritt eine neue schwache Bande 9 von sehr niederem Molekulargewicht auf. Bei völliger Reduktion erhält man wieder Bande 7 und 8, bei teilweiser Reduktion verschwinden wie bei Peak I zuerst die Banden 1 - 4, während Bande 5 nur wenig abnimmt.

Der Vergleich von Abb. 34 und 35 zeigt bei den Fairbanksgelen grundsätzlich das gleiche Muster wie bei den Laemmli-Gelen. Bande 8 ist jedoch aus unbekanntem Grund nicht mehr erkennbar. Dafür spaltet sich Bande 1 auf den Fairbanks-Gelen in zwei Komponenten (1a und 1b) auf, die beide relativ weit in das Gel einwandern. Auch für Bande 6 beobachtet man im Fairbanks-Gel nochmals eine Aufspaltung in zwei Banden (6a und 6b).

Vergleicht man die Laemmli-Flachgele (Abb. 34) mit den Laemmli-Rundgelen (Abb. 33), so läßt sich ebenfalls eine gegenseitige Zuordnung der Banden vornehmen. Hierbei entspräche die 1 mm-Bande der Rundgele den Banden 1 - 3 der Flachgele, ebenso die 3 mm-, 6 mm-, 22 mm- und 26 mm-Banden den Banden 4, 5, 7 und 8. Da der in Abb. 33 verwendete Inkubationspuffer (0,1 M KNaPP pH 7,6) dem in Abb. 34 A und C verwendeten Puffer (0,1 M KNaPP pH 8,0) relativ nahe kommt, erhält man für

Fraktion 52 und 56 in Abb. 33 ähnliche Bandenmuster wie für Peak I und Peak II in Abb. 34 A und C. Allerdings sind bei dieser Zuordnung die R_F-Werte besonders der hochmolekularen Banden der Flachgele wesentlich größer als die der entsprechenden Banden der Rundgele. Ob dies am ungenauen Schneiden der Rundgele liegt oder an der Verschiedenheit der Geometrie und der Elektrophoresebedingungen bei den Rund- und Flachgelen, ist noch unklar.

Die Ergebnisse der Elektrophoresen aus Abb. 34 und 35 lassen den Schluß zu, daß zwischen den Rezeptorspezies von Peak I und Peak II erhebliche strukturelle Übereinstimmungen bestehen. So liefert Peak II, wenn er wie Peak I in 0,1 M KNaPP pH 8,0 photoaffinitätsmarkiert wurde, das gleiche Bandenmuster, allerdings mit anderer Gewichtung der Banden. Weiterhin tritt Bande 5, die Hauptbande von Peak II (insbesondere wenn dieser beim niederionischen Optimum inkubiert wurde), auch bei Peak I auf, vor allem nach partieller Reduktion. Schließlich liefern beide Peaks, egal unter welchen Inkubationsbedingungen, nach vollständiger Reduktion die gleiche starke Bande 7 und auf Laemmli-Gelen eine schwache Bande 8.

5.11.3. SDS-PAGE und Anfärbung verschiedener Rezeptorpräparate

Den in Abb. 36 gezeigten Autoradiogrammen werden in Abb. 37 Fotografien gefärbter Flachgele nach Laemmli und Fairbanks gegenübergestellt, die das Proteinmuster von Lebermembranen, Membranextrakt, Con A-Überstand, Con A-Eluat, einer Peak I- und einer Peak II-Fraktion, jeweils nichtreduziert und reduziert, sowie die Banden verschiedener Standardproteine zur Molekulargewichtsbestimmung zeigen. An den Abbildungen läßt sich gut der Reinigungsverlauf von Lebermembranen über Extrakt zu Con A-Eluat bzw. Peak I und Peak II verfolgen, wobei allerdings die schlechtere Anfärbbarkeit der im Con A-Eluat enthaltenen Glykoproteine durch Coomassie Blue berücksichtigt werden muß. Bei den Standardproteinen erwies sich Thyroglobulin als sehr heterogen, die Bande mit MG 330.000

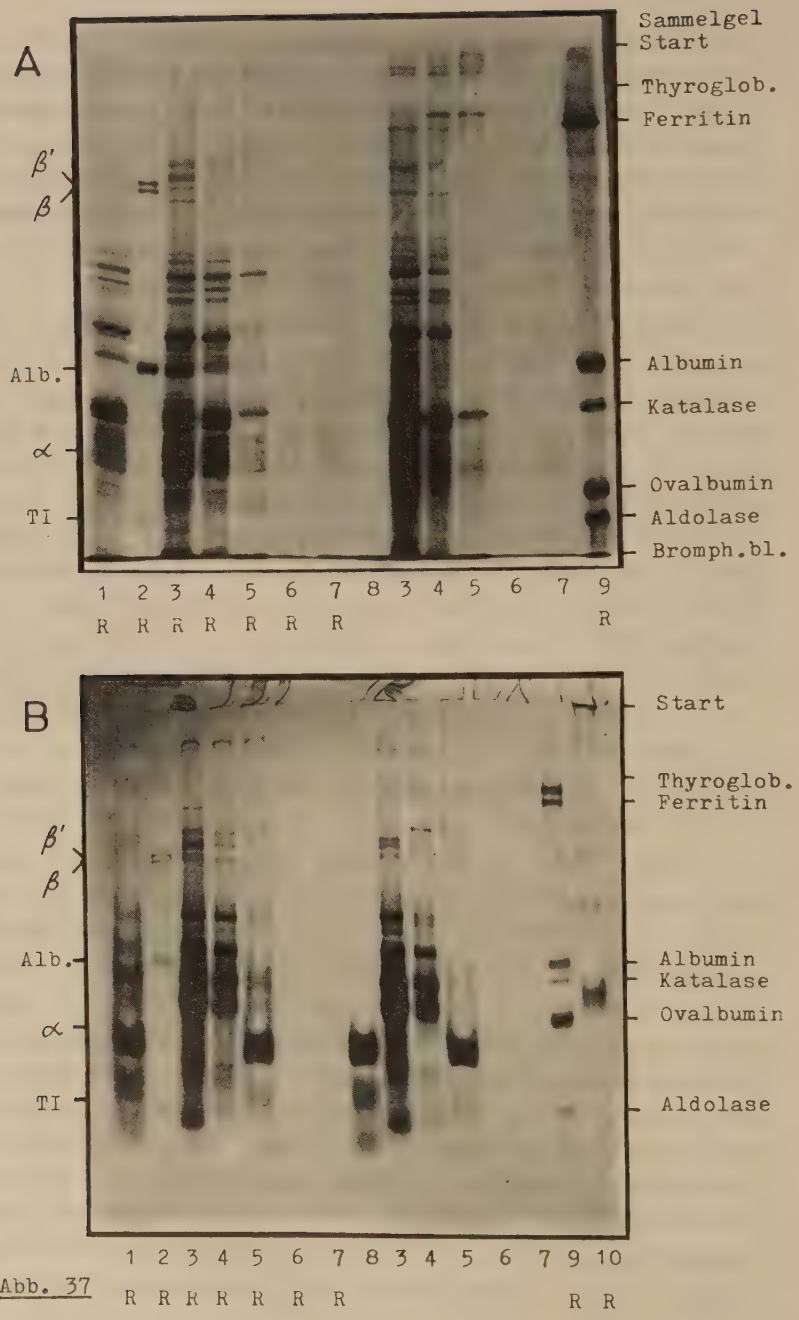

A
Sammelgel
Start
Thyroglob.
Ferritin
β'
β
Alb.
α
TI
Albumin
Katalase
Ovalbumin
Aldolase
Bromph.bl.
1 2 3 4 5 6 7 8 3 4 5 6 7 9
R R R R R R R R
B
Start
Thyroglob.
Ferritin
β'
β
Alb.
α
TI
Albumin
Katalase
Ovalbumin
Aldolase
1 2 3 4 5 6 7 8 3 4 5 6 7 9 10
R R R R R R R R R

Abb. 37

ist durch einen Pfeil bezeichnet, ebenso die Ferritinbande mit MG 220.000. Der Standard-Kit von BDH war nur bei Fairbanks-Elektrophoresen brauchbar, bei Laemmli-Elektrophoresen ergaben sich keine Banden.

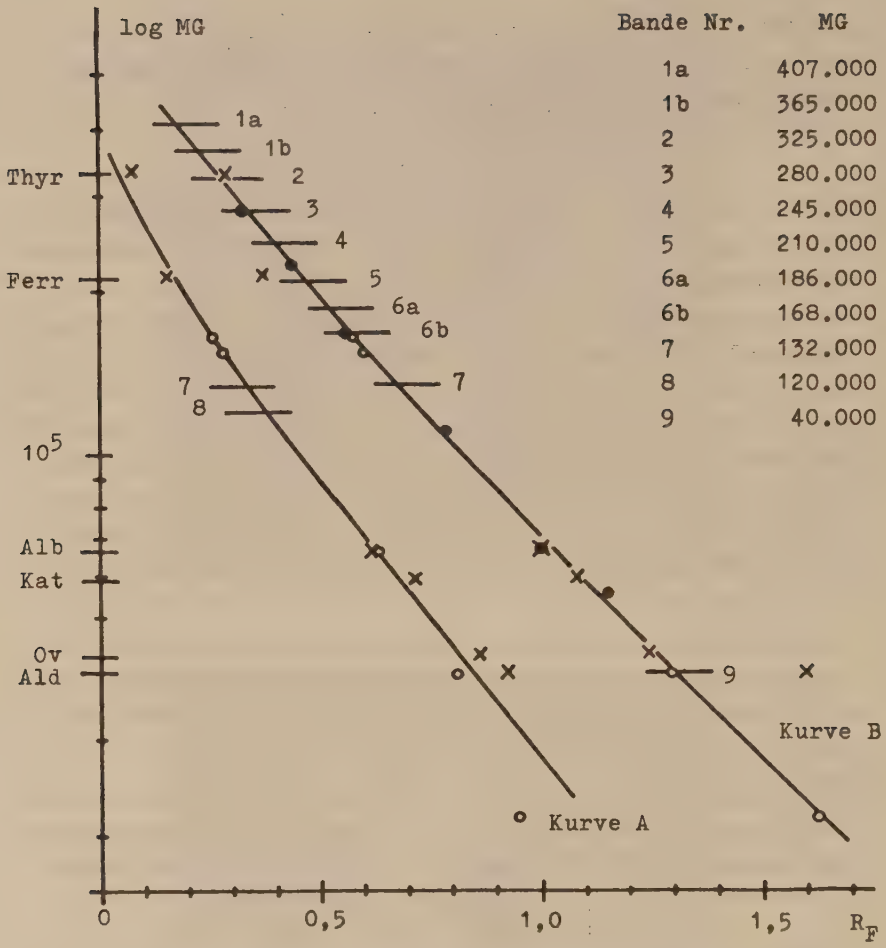
5.11.4. Molekulargewichtsbestimmungen mittels SDS-PAGE

Abb. 38 zeigt die Molekulargewichtsbestimmung der gefundenen Rezeptorbanden an Flachgelen nach Laemmli bzw. Fairbanks. Aufgrund seiner hohen Trenngelkonzentration ist das Laemmli-Gel nicht zur Molekulargewichtsbestimmung der Banden 1 - 5 geeignet. Die R_F-Werte dieser Banden sind zu klein und schwanken zu stark, um sie zur Auswertung verwerten zu können. Wie man sieht, ist aber auch für den niedermolekularen Bereich wegen erheblicher Streuung bei den Standardproteinen keine Auswertung möglich. Lediglich für die Banden 6 - 8 lassen sich Molekulargewichte angeben, was für Bande 8 wichtig ist, da sie nur im Laemmli-Gel beobachtet werden konnte.

Dagegen lassen sich mit dem Fairbanks-Gel reproduzierbare Molekulargewichtsbestimmungen aller Banden durchführen. Bis auf Ferritin und Aldolase ordnen sich hier sämtliche Standardproteine auf einer leicht gebogenen Kurve an.

Eine prinzipielle Komplikation erschwert jedoch alle Molekulargewichtsbestimmungen. Wie schon erwähnt, wandern die Banden reduzierter Proben langsamer im Gel als die nichtreduzierter Proben. Da die Standardproteine reduziert werden,

Abb. 37 SDS-PAGE und Anfärbung von Rezeptorpräparaten an Flachgelen nach Laemmli (A) und Fairbanks (B). Aufgetragene Proben: 1 = Con A-Überstand, 2 = Boehringer-Standard (β', β, Alb, α, TI , vgl. 4.11.2.), 3 = Lebermembranen, 4 = Membranextrakt, 5 = Con A-Eluat, 6 = Peak I-Fraktion, 7 = Peak II-Fraktion, 8 = Con A, 9 = verschiedene Standardproteine (Thyroglobulin, Ferritin, Albumin, Katalase, Ovalbumin, Aldolase), 10 = BDH-Standard. R = die Probe wurde mit 80 mM DTE reduziert (die Standardproteine wurden wie in 4.11.2. angegeben reduziert). Nach der Elektrophorese wurde das Laemmli-Gel gefärbt, getrocknet und fotografiert, das Fairbanks-Gel wurde gefärbt und direkt fotografiert.



Bande Nr.	MG
1a	407.000
1b	365.000
2	325.000
3	280.000
4	245.000
5	210.000
6a	186.000
6b	168.000
7	132.000
8	120.000
9	40.000

Abb. 38 Molekulargewichtsbestimmungen der Rezeptorbanden von Peak I und Peak II nach Laemmli (Kurve A) und Fairbanks (Kurve B). Aufstellung der Eichkurven: vgl. 4.11.2. Als Standardproteine wurden verwendet: Standard-Kit von Boehringer (○), Standard-Kit von BDH (●), Verschiedene (×): Thyroglobulin (Thyr), Ferritin (Ferr), Albumin (Alb), Katalase (Kat), Ovalbumin (Ov) und Aldolase (Ald). Peak I und Peak II wurden wie in der Legende zu Abb. 34 beschrieben photoaffinitätsmarkiert und gegebenenfalls reduziert. Jeweils 25 µl der Rezeptorproben bzw. der Standardproteinmischungen wurden aufgetragen. Nach der Elektrophorese wurden die Gele gefärbt, getrocknet und autoradiografiert und die R_F-Werte der Standardproteine und der Rezeptorbanden (1a - 9) bestimmt.

die Mehrzahl der Rezeptorbanden jedoch nur im nichtreduzierten Zustand zu beobachten ist, sind beide strenggenommen nicht vergleichbar. Als Behelfslösung wurde so verfahren, daß von den R_F-Werten aller nichtreduzierten Banden ca. 10% des Zahlenwertes abgezogen wurde (um soviel liefen die reduzierten Banden durchschnittlich weniger weit) und diese neuen R_F-Werte zur Bestimmung der Molekulargewichte verwendet wurden.

Die ermittelten Molekulargewichte der verschiedenen Rezeptorbanden sind in Abb. 38 angegeben. Für die vier Hauptbanden erhält man demnach MG 325.000 (Bande 2), MG 245.000 (Bande 4), MG 210.000 (Bande 5) und MG 132.000 (Bande 7). Es fällt auf, daß zwischen den Banden 1a - 5 jeweils ein Abstand von 35.000 - 45.000 besteht. Bande 9 besitzt ebenfalls diese Größe. Weitere Gesetzmäßigkeiten sind nicht direkt erkennbar, in der anschließenden Diskussion wird jedoch auf Ergebnisse und neuere Vorstellungen zur Rezeptorstruktur eingegangen, mit denen das gefundene Bandenmuster vergleichbar ist.

6. DISKUSSION

6.1. PARTIELLE REINIGUNG DES INSULINREZEPTORS

In der vorliegenden Arbeit wurden drei verschiedene Verfahren zur Reinigung des Insulinrezeptors aus Rattenlebermembranextrakt untersucht: Gelfiltration an Sepharose 4B CL, Con A-Sepharose-Behandlung und Con A-Fällung des Extrakts. Ziel dieser Versuche war nicht die vollständige Reinigung des Insulinrezeptors, sondern die Abtrennung des Rezeptors von der überwiegenden Menge der Begleitproteine und insbesondere der Insulin-Abbauaktivität, um ihn in seinen Eigenschaften ungestört untersuchen zu können.

Reinigungen des Insulinrezeptors mittels Gelfiltration, meist an Sepharose 6B, sowie mittels Affinitätschromatografie an Con A-Sepharose werden von verschiedenen Arbeitsgruppen beschrieben (vgl. Einleitung). Statt Sepharose 6B wurde in dieser Arbeit Sepharose 4B CL verwendet, was jedoch auf die Qualität der Trennung von Peak I, Peak II, Abbau- und Proteinpeak keinen Einfluß hat, wie auch die Molekulargewichtsbestimmungen an beiden Trenngelen (5.9.) zeigen. Ebenfalls abweichend von der bisherigen Literatur wurde die Reinigung mit Con A-Sepharose nicht über Säulentrennung, sondern im Batch-Verfahren durchgeführt. Der Vorteil des Batch-Verfahrens liegt in der einfacheren Handhabung, der vollständigeren Assoziation des Rezeptors an die Con A-Sepharose, sowie seiner besseren Eluierbarkeit, die beim Säulenverfahren trotz optimaler Elutionsbedingungen teilweise unbefriedigend war (67,78).

Das dritte hier beschriebene Verfahren, die Fällung mit Con A, wurde bisher zur Reinigung von Glykoproteinen erst sehr selten eingesetzt. In einer neueren Arbeit verwenden Latner et al. (95) einen Con A-Fällungsschritt bei der Reinigung von menschlicher alkalischer Phosphatase. Die von ihnen in diesem Schritt erzielte 6-fache Anreicherung ist mit der 4-fachen Anreicherung des Insulinrezeptors vergleichbar. Der besondere Vorteil der Con A-Fällung, gerade auch ge-

genüber den beiden vorgenannten Verfahren, besteht in der Möglichkeit, auf einfache und relativ billige Weise große Mengen von Extrakt vom Hauptteil des Proteins, insbesondere der Insulin-Abbauaktivität, zu befreien. Durch Elution des Con A-Präzipitats mit kleinen Volumina lassen sich hochkonzentrierte Rezeptorlösungen herstellen.

Das so gewonnene Con A-Eluat kann sowohl als Ausgangsmaterial für weitere Reinigungsschritte dienen als auch in Radiorezeptortests als Rezeptorquelle verwendet werden. Unter einem Radiorezeptortest (für Insulin) versteht man dabei einen Isotopenverdrängungstest, mit dem sich analog dem Radioimmuntest die Wirkungsstärken von Insulinderivaten oder unbekannte Insulinkonzentrationen messen lassen (73,84,116, 133). Die Abwesenheit von Insulin-Abbauaktivitäten ist beim Radiorezeptortest besonders wichtig, da Insulinabbau alle Bindungsergebnisse verfälscht. Wie in 5.1. gezeigt wurde, verschieben sich dabei Verdrängungskurven und K_{50}-Werte nach rechts (Abb. 4), was eine zunehmende Unempfindlichkeit des Radiorezeptortests zur Folge hat. Mit Con A-Eluat lassen sich dagegen sehr empfindliche Radiorezeptortests durchführen, die beispielsweise zur Bestimmung von Insulinkonzentrationen in Patientenserum eingesetzt werden können (51).

6.2. UNTERSUCHUNG DER INSULIN-ABBAUAKTIVITÄT

Der Wunsch nach abbaufreien Rezeptorlösungen war ein Grund für die Beschäftigung mit dem Insulinabbau in dieser Arbeit. Ein weiterer Grund war das gemeinsame Auftreten des Abbaupeaks mit einem Bindungspeak bei der Gelfiltration von Membranextrakt (Abb. 8). Angesichts der Diskussion über die gegenseitige Unabhängigkeit oder Abhängigkeit von Insulinbindung und Insulinabbau (vgl. Einleitung) stellte sich die Frage nach der Bedeutung dieses Befundes. Verschiedene Versuche ergaben, daß die Abbau- und Bindungsaktivität der beiden Peaks bezüglich Stabilität, Nicht-Bindung an Con A, Inhibierbarkeit und Aktivierbarkeit paralleles Verhalten zeigten. Die gemeinsame Elution war also nicht zufällig, vielmehr lag

beiden Aktivitäten offensichtlich ein gemeinsames Molekül zugrunde. In 5.2.2. wurde dazu die Hypothese aufgestellt, daß es sich um ein insulinabbauendes Enzym handelt, wobei der zugehörige Bindungspeak die spezifische Substratbindung dieses Enzyms darstellt. Aufgrund der Aktivierungsversuche mit GSH und Ca^{++}/Mn^{++} (Abb. 9) wurde weitergehend sogar auf zwei Abbauenzyme geschlossen, die bei der Gelfiltration in (fast) gleicher Position eluiert werden.

In der Rezeptor-Literatur wird über die Abtrennung einer Insulin-Abbauaktivität vom Insulinrezeptor über Gelfiltration von Membranextrakt oder Affinitätschromatografie an Lectin-Sepharose nur selten berichtet (57,78,89,93,140). In zwei Fällen wurde dabei ebenfalls ein mit dem Abbaupeak assoziierter Bindungspeak erhalten (89,93). Es ist jedoch fraglich, ob diese Abbauaktivitäten mit den eigenen gefundenen vergleichbar sind, da bis auf (89) Membranextrakte anderer Gewebe verwendet wurden und die ermittelten Molekulargewichte und Stokes'Radien z.T. erheblich abweichen. Durch Strahlungsinaktivierung ließ sich ebenfalls das Vorliegen einer Abbauaktivität neben dem Insulinrezeptor in Lebermembranextrakt zeigen (54).

6.3. HOMOGENITÄT VON PEAK I UND PEAK II

Bei den anfänglichen Gelfiltrationen von Membranextrakt zeigten die Fraktionen des 1. Bindungspeaks in ihrem Bindungsverhalten Inhomogenität (Abb. 10). Dies wird aufgrund der späteren Versuche, die eine Auftrennung des 1. Bindungspeaks in Peak I und Peak II ergaben, verständlich. Die Homogenität von Peak I und Peak II muß jedoch gesichert sein, um Fehlinterpretationen z.B. von Scatchard-Diagrammen und Elektrophorese-Bandenmustern zu vermeiden. Homogenität bedeutet zweierlei: zum einen muß im Peak eine einheitliche Rezeptorspezies vorliegen, zum zweiten darf diese sich mit der Zeit, z.B. während der Lagerung, nicht in ihren Eigenschaften (Größe, Bindungsverhalten u.a.) verändern.

Größenveränderungen der Rezeptoren von Peak I und Peak II

(durch Assoziation, Dissoziation oder Abspaltung von Bruchstücken) können unter Normalbedingungen (keine Reduktion, keine Anwesenheit von SDS) ausgeschlossen werden, da beide Peaks bis auf gelegentliche Nebenpeaks symmetrisch rechromatografierbar sind (Abb. 19). Weiterhin werden Fraktionen beider Peaks nach Photoaffinitätsmarkierung in derselben Position eluiert wie die Peaks, aus denen sie stammen (Abb. 32). An der Größe der Rezeptorspezies von Peak I und Peak II ändert auch die Anwesenheit von Insulin (als ^{125}J-Insulin oder ^{125}J-MABI) nichts (Abb. 6 und 7 sowie Abb. 32). Sie wird ebenfalls nicht beeinflußt durch verschiedene pH- und Ionenstärkebedingungen: so ist die Größe unabhängig vom Elutionspuffer und beim Peak II-Rezeptor unabhängig davon, ob die Photoaffinitätsmarkierung beim niederionischen oder hochionischen Bindungsoptimum vorgenommen wurde (Abb. 32). Desgleichen findet man nach Rechromatografie von Peak I und Peak II auch kein verändertes Bindungsverhalten.

Eine gegenseitige Kontamination von Peak I und Peak II wurde dadurch ausgeschlossen, daß nur Fraktionen aus dem aufsteigenden Ast von Peak I bzw. dem absteigenden Ast von Peak II für die Versuche verwendet wurden. Daß diese Fraktionen tatsächlich nicht kontaminiert sind, zeigen z.B. die pH- und Ionenstärke-Diagramme in Abb. 21 oder die konstanten Bindungsverhältnisse von Peak II bei pH 6,8 und pH 7,8 (Abb. 27).

Die untersuchten Rezeptoren von Peak I und Peak II sind also unter Normalbedingungen stabil und einheitlich und wandeln sich nicht ineinander um, auch nicht unter dem Einfluß von Insulin (45).

6.4. pH- UND IONENSTÄRKEABHÄNGIGKEIT DER INSULINBINDUNG VON PEAK I UND PEAK II

Die Bestimmung der pH- und Ionenstärkeabhängigkeit der spezifischen Bindung ergab für Peak I ein Optimum bei pH 8,0 und hoher Ionenstärke, für Peak II ein niederionisches Optimum bei pH 7,2 und niedriger Ionenstärke und ein hochioni-

sches Optimum bei pH 8,0 und hoher Ionenstärke (Abb. 23).

In der Literatur liegen bisher nur wenige meist gegensätzliche Angaben zum Einfluß von Ionenstärke und pH auf die Insulin-Rezeptor-Bindung vor. So hatte 2 M NaCl teilweise einen erhöhenden (17,74), teilweise keinen Effekt (7) auf die Bindung von Lebermembranen, ebenso nahm beim gelösten Rezeptor die Bindung mit steigender Ionenstärke teilweise zu (51), teilweise blieb sie unverändert (20,55,93). Das pH-Optimum lag sowohl für gelösten als auch für membrangebundenen Rezeptor meist zwischen 7,6 und 8,2 (53,55,80,140), wobei auch die Temperatur einen Einfluß hatte (139). Nur in drei Fällen wurden zwei pH-Optima gefunden, wobei das 2. Optimum entweder als Schulter in der pH-Kurve auftrat (109,130) oder sich bei Änderung der Pufferkonzentration in einer Verschiebung der pH-Kurve äußerte (51).

Der in dieser Arbeit gefundene pH- und Ionenstärkeeinfluß auf die Bindung von Peak I und Peak II zeichnet sich dadurch aus, daß die Optima bei extremen Ionenstärken liegen. Es wurde daher vermutet, daß pH und Ionenstärke neben dem Ionisierungszustand der eigentlichen Bindungszentren auch die Konformation der Rezeptoren beeinflussen oder Assoziations- oder Dissoziationsvorgänge bei den Rezeptoren bewirken. Die letzte Möglichkeit kann nach dem Gesagten ausgeschlossen werden, da sich keine Größenveränderungen der Rezeptoren von Peak I und Peak II auch unter dem Einfluß extrem verschiedener Puffer nachweisen lassen.

Dagegen sind pH- und Ionenstärke-induzierte Konformationsänderungen der Rezeptoren der beiden Peaks durchaus wahrscheinlich. Diese könnten zwei prinzipiell verschiedene Auswirkungen auf das Bindungsverhalten von Peak I und Peak II haben: sie könnten zum einen das Bindungsverhalten der Bindungszentren modifizieren, zum zweiten könnten sie zum Freiwerden oder Verschwinden von Bindungsstellen an den Rezeptoren führen. Diese letztere Möglichkeit kann ebenfalls ausgeschlossen werden: die Scatchard-Diagramme für Peak I und Peak II in Abb. 28 und 29 zeigen, daß unabhängig von den pH- und

Ionenstärkebedingungen im Bindungstest die Bindungskapazitäten jeweils gleichbleiben, es findet also keine Zu- oder Abnahme von Bindungsstellen statt.

Als Resultat ergibt sich daher: alle Bindungsstellen an den Rezeptoren von Peak I und Peak II sind jederzeit für Insulin erreichbar, je nach pH und Ionenstärke binden sie Insulin jedoch mit unterschiedlicher Affinität. Die Steilheit der 1. Geraden in den Scatchard-Diagrammen spiegelt diese wieder. Der Einfluß von pH und Ionenstärke auf die Bindung der beiden Peaks kann dabei sowohl auf direktem Wege (über den Ionisierungszustand der jeweiligen Bindungszentren) als auch auf indirektem Wege (über Konformationsänderungen der jeweiligen Rezeptoren mit einhergehender Modifizierung der Konformation der Bindungszentren) erfolgen.

Speziell für Peak II mit seinen beiden je nach Ionenstärke unterschiedlichen pH-Optima stellt sich eine weitere Frage: besitzt der Rezeptor von Peak II zwei verschiedene Sorten von Bindungsstellen (von denen die eine evtl. der Bindungsstelle von Peak I gleicht oder ähnelt) oder besitzt er nur eine Sorte von Bindungsstellen? Im letzteren Fall wäre die Erklärung der komplizierten pH-, Ionenstärke- und Temperaturabhängigkeit der Bindung von Peak II zwar schwieriger, aber dennoch möglich, etwa durch Zusammenwirken mehrerer ionisierbarer Gruppen und / oder Konformationsänderungen des Rezeptors (s.o.).

Für zwei verschiedene Bindungsstellen sprechen die unterschiedlichen Bandenmuster von Peak II in der SDS-PAGE nach Photoaffinitätsmarkierung beim niederionischen und hochionischen Optimum (Abb. 34 und 35), für eine Bindungsstelle spricht die Existenz nur einer reduzierten Bande 7 (mit Nebenbande 8, die aber immer im selben Verhältnis zu Bande 7 auftritt). Zu beiden Argumenten gibt es Gegenargumente: so lassen sich Gründe konstruieren, nach denen die zwei verschiedenen Bandenmuster auch mit nur einer Bindungsstelle vereinbar sind, ebenso kann die nach Reduktion erhaltene eine Untereinheit auch zwei verschiedene Bindungszentren

tragen oder diese Untereinheit kann im Rezeptormolekül in zwei verschiedenen Konformationen vorliegen, die Insulin unterschiedlich binden.

6.5. SCATCHARD-DIAGRAMME DER INSULINBINDUNG VON PEAK I UND PEAK II

Die Untersuchung der Insulinbindung sowohl von Peak I als auch von Peak II lieferte bei fast allen pH- und Ionenstärkebedingungen nichtlineare Scatchard-Diagramme. Prinzipiell gibt es für das Auftreten solcher nichtlinearen Diagramme verschiedene Erklärungen (30,32,35,82,110,131,134), hier sollen jedoch als Ursachen nur negative Kooperativität und Heterogenität der Bindungsstellen in Betracht gezogen werden.

Bei der Interpretation aller Scatchard-Diagramme ist grundsätzlich eine gewisse Vorsicht geboten. Auch in dieser Arbeit zeigten besonders die Werte für die hohen Insulinkonzentrationen oft eine beträchtliche Streuung. Während daher die K_D-Werte für die 1. Gerade meist gut reproduzierbar waren, vor allem dann, wenn die Bindung bei optimalen pH- und Ionenstärkebedingungen bestimmt wurde, schwankten die K_D-Werte für die 2. Gerade teilweise erheblich. Trotzdem ist sicher, daß die 2. Gerade eine Bindungseigenschaft von Peak I bzw. Peak II wiederspiegelt und kein Artefakt darstellt, zumal ihre Steigung eine unterschiedliche pH- und Ionenstärkeabhängigkeit aufweist (Abb. 28 und 29).

Verschiedentlich wurden im Verlauf dieser Arbeit 'fast' lineare Scatchard-Diagramme erhalten. Dies war vor allem dann der Fall, wenn bei pH 7,4 und höheren Ionenstärken inkubiert wurde, so in Abb. 10 bei den Anfangsfraktionen des 1. Bindungspeaks (wegen ihrer Identität mit Peak I), in Abb. 28 D bei Peak I und in Abb. 29 D bei Peak II. 'Fast' lineare Scatchard-Kurven traten jedoch auch bei Con A-Sepharose-Eluat und Con A-Eluat auf (Abb. 12 und 16), obwohl beide Eluate sowohl Peak I als auch Peak II enthalten (Abb. 18). Eine Erklärung für diesen Befund ist noch nicht möglich. Er wäre

nur dann verständlich, wenn die Dissoziationskonstanten für beide Peaks in 0,1 M KNaPP pH 7,4 (dem Inkubationspuffer für die Bindungstests in Abb. 12 und 16) gleich wären. Das war jedoch bei getrennter Untersuchung von Peak I und Peak II nur annähernd der Fall. Die Gegenwart von Con A dürfte für diesen Effekt keine Rolle spielen, da beide Eluate 0,1 - 0,3 M MeMan enthalten.

Die Ursache für die Nichtlinearität der anderen Scatchard-Diagramme ist zur Zeit ebenfalls noch unklar. Einige Überlegungen zu dieser Frage lassen sich dennoch anstellen: so könnten die 'fast' linearen Scatchard-Diagramme von Peak I und Peak II bei pH 7,4 und höherer Ionenstärke bedeuten, daß die Rezeptoren beider Peaks nur eine Sorte von Bindungsstellen besitzen, die bei diesen Bedingungen alle ungefähr gleiches Bindungsverhalten zeigen, sich also relativ homogen verhalten. Als Erklärung für die nichtlinearen Scatchard-Diagramme bei den anderen pH-Werten und Ionenstärken könnte man dann eine pH- und Ionenstärke-induzierte Heterogenität dieser Bindungsstellen annehmen, beispielsweise aufgrund von Konformationsänderungen im Rezeptormolekül. Bei Peak II allerdings könnte auch echte Heterogenität der Bindungsstellen vorliegen, wenn man die zwei pH-Optima als Indiz für zwei verschiedene Sorten von Bindungsstellen nimmt (s.o.). Peak I dagegen besitzt, wie seine pH- und Ionenstärkeabhängigkeit zeigt, mit großer Wahrscheinlichkeit nur eine Sorte gleicher oder ähnlicher Bindungsstellen, sodaß hier als Erklärung für die Nichtlinearität der Scatchard-Diagramme auch negative Kooperativität in Frage kommen könnte.

Wie die kurzen Überlegungen zeigen, sind die gefundenen Ergebnisse also sowohl mit einer (pH- und Ionenstärke-induzierten oder echten) Heterogenität der Bindungsstellen als auch mit negativer Kooperativität vereinbar, möglich ist auch, daß beides zusammen eine Rolle spielt.

6.6. MOLEKULARGEWICHTSBESTIMMUNGEN VON PEAK I UND PEAK II UND IHRER UNTEREINHEITEN

Molekulargewichtsbestimmungen von Peak I und Peak II wurden in dieser Arbeit mittels Gelfiltration an Sepharose 4B CL und 6B CL (Abb. 30 und 31), sowie mittels kontinuierlicher und diskontinuierlicher SDS-PAGE mit und ohne Reduktion (Abb. 38) durchgeführt. In der Literatur wurden die Molekulargewichte des Rezeptors und seiner Untereinheiten nach denselben Methoden, zusätzlich noch mittels PAGE ohne SDS und mittels Strahlungsinaktivierung bestimmt. Tabelle 6 gibt einen Überblick über die Ergebnisse der einzelnen Arbeitsgruppen.

Die verschiedenen Probleme bei der Molekulargewichtsbestimmung mittels Gelfiltration wurden in 5.9. schon erörtert. Man muß deshalb davon ausgehen, daß die ermittelten Stokes' Radien von 91 Å bzw. 79 Å für die nativen (d.h. Triton-gelösten) Rezeptorspezies von Peak I und Peak II nicht der tatsächlichen Größe entsprechen, sondern wegen des gebundenen Tritonanteils vermutlich zu groß sind. Erst recht müssen die zugehörigen Molekulargewichte von ca. 800.000 bzw. 610.000 mit Vorsicht betrachtet werden. So erhielt Cuatrecasas (20) für den von ihm gefundenen Rezeptor bei einem Stokes'Radius von 72 Å aufgrund von Sedimentationsanalysen ein Molekulargewicht von ca. 300.000. Es ist daher unwahrscheinlich, daß z.B. bei Peak II einem Stokes'Radius von 79 Å ein Molekulargewicht von 610.000 entspricht. Solange keine ergänzenden Methoden eingesetzt wurden, können daher die ermittelten Größen der Rezeptoren von Peak I und Peak II nur als ungefähre Werte angesehen werden. Allerdings kann man mit Sicherheit davon ausgehen, daß zumindest Peak I, wahrscheinlich aber auch Peak II, erheblich größer sind als der 72 Å-Rezeptor mit MG 300.000, wie er von den meisten Autoren gefunden wird (Tabelle 6).

Wie die Tabelle zeigt, werden nur von Lang et al. (93), Kuehn et al. (90) und Harmon et al. (54) für den nativen Insulinrezeptor Größen über 72 Å bzw. MG 300.000 angegeben,

Tabelle 6:

Technik	Gewebe	Markier.	MG-Daten	Referenz
Gelfiltration	Rattenleber, -fettzellen	IRK	70 Å = 300 K	Cuatrecasas (20)
	Truthahn-Erythrocyten	Bind.	72 Å = 300 K, 40 Å = 75 K	Ginsberg (45, 46)
	Rattenleber	Bind.	72 Å	Jacobs (67)
	Schweineleber	Bind.	50 Å	Peking-Gruppe(66)
	Rattenleber, menschliche Placenta u.a.	Bind.	72 Å, 38 Å	Maturo (104-106)
	Menschliche Placenta	IRK	300 K	Harrison (55)
	Meerschwein-Niere	Bind.	73 Å	Kasuga (78)
	Menschliche Placenta	Bind.	72 Å	Williams (140)
	Rattenfettzellen	CL	300 K	Heinrich (59)
	Rattenfettzellen	CL	70 Å = 300 K	Pilch (118)
	Menschliche Fibroblasten, Erythrocyten	Bind.	370 K	Hara (53)
	Rattenleber	Bind.	91 Å = 800 K, 79 Å = 610 K	Eigene Arbeit
Strahl.-Inaktiv.	Rattenleber (Membranen)	Bind.	450 K (350 + 87 K)	Harmon (54)
	Rattenleber	Bind.	950 K (850 + 104 K)	Harmon (54)

Fortsetzung:

PAGE	Rattenleber, -fettzellen	Bind.	2 Spezies	Krupp (87-89)
	Lymphocyten (IM-9)	IRK, Bind.	68 Å = 1000 K	Lang (93)
	Schweine-leber	PAM	300 K, 600 K	Kuehn (90)
	Menschliche Placenta	C.Blue	300 K	Williams (140)
SDS-PAGE ohne und mit Re-duktion	Rattenleber, men. Placenta	PAM	310 K, 135 K, 45 K	Jacobs (68,70)
	Rattenleber, menschliche Placenta	125 J	310 K, 180 K, 135 K, 90 K, 75 K, 56 K, 45 K	Jacobs (68-70)
	Rattenleber, -fettzellen	CL	300 K, 225 K, 125 K	Pilch (117,118)
	Rattenfett-zellen	CL	320 ± 30 K, 200 K, 160 K, 125 K, 35 K	Czech (28)
	Rattenleber, -fettzellen	CL	350 K, 320 K, 290 K, 210 K, 160 K, 125 K, 90 K, 49 K	Massague, Czech (29,103)
	Rattenleber	PAM	407 K, 365 K, 325 K, 280 K, 245 K, 210 K, 186 K, 168 K, 132 K, 120 K, 40 K	Eigene Arbeit
SDS-PAGE mit Re-duktion	Rattenleber u.a. Gewebe	PAM	130 K, 90 K	Yip (144-146)
	Rattenleber	PAM	130 K	Yeung (143)
	Rattenleber	PAM	130 → 90 K (Ferg.-Plot)	Wisher (141)

Fortsetzung:

SDS-PAGE mit Reduktion	Lymphocyten (IM-9)	125 J	90 K, 67 K, 56 K, 34 K	Lang (92)
	Menschliche Placenta	125 J	126 K, 116 K, 90 K, 42 K	Harrison (57)
	Menschliche Placenta	C.Blue	126 K, 94 K, 42 K	Harrison (57)
	Menschliche Placenta	C.Blue	80 K, 75 K	Williams (140)
	Rattenleber	C.Blue	135 K, 90 K, 45 K	Jacobs (67,68)
	Rattenfettzellen	CL	125 K	Heinrich (59)
	Rattenfettzellen	CL	125 K	Carter-Su (14)
	Lymphocyten (IM-9)	35 S	130 K, 90 K	Von Obberghen (136)

Tab. 6 Molekulargewichtsdaten des Insulinrezeptors und seiner Untereinheiten in der Literatur. Die zur Bestimmung der Molekulargewichtsdaten verwendeten Nachweis- und Markierungsmethoden des Rezeptors sind wie folgt abgekürzt: Bind.: Nachweis mittels 125J-Insulin-Bindungstest (im Fall des nativen Rezeptors); IRK: Nachweis als (nichtkovalenter) 125J-Insulin-Rezeptor-Komplex; PAM: Photoaffinitätsmarkierung des Rezeptors; CL: Vernetzung des Rezeptors mit 125J-Insulin mittels Disuccinimidyl-Suberat; 125 J: Jodierung des Rezeptors nach der Lactoperoxidase- oder Chloramin T-Methode; 35 S: biosynthetische Markierung des Rezeptors mit 35S-Methionin; C.Blue: Anfärbung des Rezeptors oder seiner Untereinheiten nach Elektrophorese mit Coomassie Blue. K = kilo-Dalton.

von Krupp et al. (87 - 89) liegen leider keine Größenangaben vor. Ob die von diesen Autoren charakterisierten Rezeptorspezies mit Peak I oder Peak II vergleichbar sind, ist jedoch unklar, da die Molekulargewichtsbestimmung in keinem der Fälle mittels Gelfiltration erfolgte.

Bei Molekulargewichtsbestimmungen mittels SDS-PAGE treten, besonders unter reduzierenden Bedingungen, eine Reihe anderer Probleme auf, die einen Vergleich der Ergebnisse verschiedener Arbeitsgruppen erschweren. Bei allen Rezeptoruntersuchungen gilt, daß der Rezeptor oder eine Untereinheit nur dann nachgewiesen werden können, wenn sie entweder ^{125}J-Insulin binden oder vorher auf irgendeine Weise markiert wurden. In Tabelle 6 sind die jeweils verwendeten Markierungsmethoden mit aufgeführt. Es ist einleuchtend, daß bei unterschiedlichen Markierungsmethoden in der SDS-PAGE Banden fehlen oder zusätzlich auftreten können. Das kann sowohl durch unterschiedliche Erreichbarkeit einzelner Untereinheiten während der Markierungsreaktion als auch durch unterschiedliche Nebenreaktionen (z.B. durch Crosslinking, Chloramin T, UV-Strahlung) bedingt sein.

Ein weiteres Problem, speziell bei Photoaffinitätsmarkierungen, wurde schon erwähnt: bei der Reduktion werden A- und B-Kette des Insulins voneinander getrennt. Liegen die photoreaktive Gruppe und das ^{125}J in verschiedenen Ketten, können bei der Reduktion bis zu 90% der Radioaktivität einer Bande verlorengehen, es können also Banden scheinbar verschwinden.

Ebenfalls erwähnt wurde die unterschiedliche Laufgeschwindigkeit reduzierter und nichtreduzierter Banden während der Elektrophorese. Werden die R_F-Werte nicht entsprechend korrigiert, sind dieselben Banden bei verschiedenen Autoren nicht vergleichbar, wenn sie beim einen Autor schon im nichtreduzierten Zustand auftreten, beim anderen erst im reduzierten, was besonders für die mittelgroßen Banden zutrifft.

Eine weitere Komplikation kommt dadurch zustande, daß der Insulinrezeptor als Glykoprotein in SDS-Polyacrylamidgelen

anormal läuft und daher dieselbe Bande bei verschiedenen Gelkonzentrationen unterschiedliche R_F-Werte besitzt. So erhielten Wisher et al.(141) für eine Rezeptorbande vom scheinbaren MG 130.000 aufgrund eines Ferguson-Diagramms ein wahres Molekulargewicht von 90.000.

Schließlich können Rezeptor oder Rezeptoruntereinheiten je nach der angewandten Präparationsmethode enzymatisch oder chemisch verändert worden sein, was zum Auftreten neuer Banden führt. So konnte gezeigt werden, daß die Bande mit MG 135.000 nach Neuraminidase-Behandlung des Rezeptors zum MG 120.000 - 125.000 verschoben war (57,69,70,136,146). Allgemein führte die Behandlung mit Glycosidasen zu einer grösseren Beweglichkeit der Banden im Gel. Die von Massague et al. (103) gefundene Bande mit MG 49.000 soll dagegen durch proteolytische Spaltung aus der Bande mit MG 90.000 hervorgehen.

Diese Bemerkungen machen verständlich, daß das Spektrum der von den verschiedenen Arbeitsgruppen gefundenen Rezeptorbanden in der SDS-PAGE sehr groß ist. Trotzdem lassen sich fünf Gruppen zusammenfassen (vgl. Tabelle 6):

1. Gruppe: MG 290.000 - 350.000,
2. Gruppe: MG 160.000 - 225.000,
3. Gruppe: MG 115.000 - 135.000,
4. Gruppe: MG 80.000 - 90.000,
5. Gruppe: MG 40.000 - 50.000.

Die Banden der 1. Gruppe treten ohne Reduktion auf, bei schwacher Reduktion (meist mit 0,5 mM DTT) erscheinen die Banden der 2. und 3. Gruppe, bei starker Reduktion kommen bei manchen Autoren noch Banden der 4. und 5. Gruppe dazu. Mit dem Auftreten der Banden aus Gruppe 3 - 5 bei zunehmender Reduktion ist das Verschwinden der Banden aus Gruppe 1 und 2 verbunden. Gruppe 3 scheint eine zentrale Untereinheit des Rezeptors zu enthalten, sie wird von allen Arbeitsgruppen nach Reduktion des Rezeptors gefunden außer von Lang et al. (92) und Williams et al. (140). Bei Rezeptormarkierung mit ^{125}J erhält man zwischen MG 30.000 und 100.000 4 - 5 Banden

(69,92).

Das eigene in der SDS-PAGE gefundene Bandenmuster (Abb. 34 und 35) paßt relativ gut in dieses Schema. Aus der 1. Gruppe wurden für Peak I und Peak II ohne Reduktion 5 Banden zwischen MG 245.000 und 407.000 gefunden (Bande 1a - 4 in Abb. 35 A und C). Da beide Peaks aufgrund ihres in der Gelfiltration ermittelten Molekulargewichts nicht aus diesen 5 verschiedenen Untereinheiten zusammengesetzt sein können, müssen einige der Banden 1a - 4 durch Assoziation, Dissoziation oder Abspaltung aus einer oder höchstens zwei ursprünglichen Banden hervorgegangen sein. Diese Prozesse müssen sich während der SDS-Behandlung der Proben für die Elektrophorese ereignet haben, da nach dem früher Gesagten Peak I und Peak II homogen sind und sich durch Lagerung und Photoaffinitätsmarkierung nichts an ihrer Größe ändert. Die assoziierten, dissoziierten oder abgespaltenen Einheiten könnten das Molekulargewicht 35.000 - 45.000 besitzen, was die konstanten Abstände zwischen Bande 1a - 4 erklären würde.

Aus der 2. Gruppe von Banden wurden in der eigenen Arbeit die Banden 5, 6a und 6b vom MG 210.000, 186.000 und 168.000 gefunden. Bande 5 tritt bei Peak II grundsätzlich, bei Peak I erst nach leichter Reduktion auf. Die Banden 6a und 6b sind möglicherweise wieder Dissoziations- oder Spaltprodukte, sie waren nur bei Peak II nach Photoaffinitätsmarkierung beim niederionischen Optimum zu sehen.

Aus der 3. Gruppe treten bei völliger Reduktion von Peak I und Peak II Bande 7 und 8 mit MG 132.000 und 120.000 auf. Dabei könnte Bande 8, wie oben diskutiert, mit Bande 7 bis auf abgespaltene Sialinsäurereste identisch sein.

Aus der 4. und 5. Gruppe wurde nur die schwache Bande 9 mit MG 40.000 für Peak II nach Photoaffinitätsmarkierung beim hochionischen Optimum gefunden. Sie könnte identisch sein mit den Differenz-Einheiten der Banden 1a - 4 (s.o.), sowie mit den Banden bei 40.000 - 50.000, die von manchen Autoren erhalten werden.

6.7. MODELLE DES INSULINREZEPTORS

Peak I und Peak II zeigen sowohl in struktureller Hinsicht als auch in ihren Bindungseigenschaften Übereinstimmungen: so treten bei beiden Peaks in der SDS-PAGE gleiche Banden auf, das hochionische pH-Optimum von Peak II und das pH- und Ionenstärke-Optimum von Peak I gleichen einander und schließlich ähnelt sich das Bindungsverhalten bei pH 7,4 und hoher Ionenstärke. Die Vermutung liegt daher nahe, daß der Rezeptor von Peak II ein Teil des Peak I-Rezeptors ist. Es fragt sich dann, welcher Art das Differenzstück zwischen den beiden Rezeptoren ist. Dazu sollen kurz die in der Literatur bisher diskutierten Modellvorstellungen zum Insulinrezeptor betrachtet werden.

Das erste Rezeptormodell wurde von Ginsberg et al. (45) aufgrund von Versuchen mit gelöstem Truthahn-Erythrocyten-Rezeptor aufgestellt. Danach soll der Rezeptor (MG 300.000) aus vier gleichen Untereinheiten vom MG 75.000 aufgebaut sein (vgl. Tabelle 6), in die er unter dem Einfluß von Insulin wieder dissoziiert, wodurch sich auch die von De Meyts et al. (30,32) postulierte negative Kooperativität erklären ließe.

Das zweite Modell geht auf die Arbeiten von Maturo et al. (104 - 106) mit gelöstem Rezeptor aus verschiedenen Geweben zurück. Die Autoren erhielten 2 Rezeptorspezies in der Grösse von 72 Å und 38 Å (vgl. Tabelle 6). Aus dem 72 Å-Rezeptor ließ sich ein nicht-Insulin-bindendes Glykoprotein abtrennen, wodurch der 38 Å-Rezeptor entstand. Nach Zugabe des Glykoproteins zum 38 Å-Rezeptor resultierte wieder die 72 Å-Form. Maturo et al. postulierten, daß das Glykoprotein Effektorfunktion habe, also bindungsmodifizierend, signalübertragend u.ä. wirken könnte. Ein ähnliches Rezeptor-Effektor-Modell wurde auch von Krupp et al. (87 - 89) für die beiden von ihm gefundenen Rezeptorspezies sowie von Harmon et al. (54) postuliert.

Ein drittes Modell für den Insulinrezeptor aus Leber- und Fettzellmembranen wird in neuerer Zeit von Jacobs et al. (69),

Czech et al. (28,29) und Massague et al. (103) vertreten: danach ist der Rezeptor in der Form $(\alpha\beta)_2$ aufgebaut, wobei α und β in der folgenden Weise über Disulfidbrücken verknüpft sind: β-S-S-α-S-S-α-S-S-β. In der älteren Version war α eine Untereinheit mit MG 125.000, β eine Untereinheit mit MG 35.000 - 45.000 (28,69), in der neueren Version wird für β ein MG von 90.000 angegeben (29), zusätzlich existiert mit β_1 vom MG 49.000 noch ein proteolytisches Spaltstück von β (103). Auf diese Weise sollen in der SDS-PAGE ohne Reduktion die Banden $(\alpha\beta)_2$, $(\alpha\beta)(\alpha\beta_1)$ und $(\alpha\beta_1)_2$ mit MG 350.000, 320.000 und 290.000, bei schwacher Reduktion $(\alpha\beta)$ und $(\alpha\beta_1)$ mit MG 210.000 und 160.000 und bei starker Reduktion α, β und β_1 zustandekommen (103) (vgl. Tabelle 6). Daß Disulfidbindungen des Rezeptors möglicherweise auch eine Rolle bei der Insulinbindung spielen, lassen die Untersuchungen von Schweitzer et al. (128) und Jacobs et al. (71) vermuten, die Veränderungen der Rezeptorbindung von Membranen in Gegenwart geringer DTT-Konzentrationen (ca. 0,5 mM) feststellten.

Ein Vergleich der eigenen Ergebnisse mit diesen drei Modellen ergibt folgendes:
Das Tetramer-Modell nach Ginsberg et al. (45) ist nicht übertragbar, da die Rezeptoren von Peak I und Peak II völlig andere Größen haben und keiner der beiden Rezeptoren eine Grössenveränderung unter dem Einfluß von Insulin erfährt.

Das Rezeptor-Effektor-Modell dagegen könnte prinzipiell in Frage kommen, allerdings nicht in der von Maturo et al. (104 - 106) gefundenen Form (s.o.). Nimmt man hypothetisch an, daß Peak I = Peak II + Effektor ist, so muß dieser Effektoranteil kovalent (auch stabil gegenüber SDS) mit Peak II verbunden sein, da Peak I und Peak II sich unter Normalbedingungen nicht ineinander umwandeln. Denkbar wäre, daß Peak II durch Proteolyse oder Disulfidspaltung aus Peak I hervorgeht, wobei diese Reaktion entweder in vivo in der Membran oder während der Rezeptorpräparation ablaufen könnte. Ein Hinweis in dieser Richtung ist der Befund von Massague et al. (103),

der das Vorkommen mehrerer Redoxformen des Insulinrezeptors in Leberzellmembranen beschreibt. Auf die Möglichkeit einer reduktiven Umwandlung deutet auch ein eigener Versuch hin, in dem gefunden wurde, daß nach Gelfiltration von Extrakt, der 1 Std. bei 4°C mit 100 mM DTE vorbehandelt worden war, nur noch Peak II im Eluat nachzuweisen war (nicht gezeigt). Denkt man in diesem Rezeptor-Effektor-Modell weiter, so hätte der Effektor die Eigenschaft, in Peak I die Insulinbindung bei pH 7,2 und niedriger Ionenstärke zu unterdrücken. Das würde nach den früher besprochenen Vorstellungen bedeuten, daß er entweder die Bindungsstelle blockiert oder einen sterischen Vorgang im Rezeptor verhindert, der die Bindung unter diesen pH- und Ionenstärkeverhältnissen ermöglicht.

Schließlich könnte auch das $(\alpha\beta)_2$-Modell von Czech und Massague (29,103) als Rezeptormodell in Frage kommen. Vergleicht man das Bandenmuster des $(\alpha\beta)_2$-Modells (s.o.) mit dem Bandenmuster von Peak I (Abb. 35 A), jeweils ohne und mit Reduktion, so entsprechen sich die Banden aufgrund ihrer Molekulargewichte in folgender Weise: $(\alpha\beta)_2$, $(\alpha\beta)(\alpha\beta_1)$, $(\alpha\beta_1)_2$ $\hat{=}$ Bande 1a - 4, $(\alpha\beta)$ $\hat{=}$ Bande 5, $(\alpha\beta_1)$ $\hat{=}$ Bande 6, $\alpha\,\hat{=}$ Bande 7. Für β und β_1 fehlen eigene Banden (das Auftreten dieser Banden scheint z.T. von der Markierungsmethode abzuhängen). Die völlige Übertragbarkeit des $(\alpha\beta)_2$-Modells auf die Struktur des Peak I-Rezeptors wird jedoch in mehrfacher Hinsicht in Frage gestellt. Zum einen hat Peak I aufgrund der Gelfiltration ein wesentlich höheres Molekulargewicht als 350.000 ($\hat{=}$ $(\alpha\beta)_2$). Zum zweiten wird es schwierig, Peak II in diesem Modell unterzubringen, wenn man davon ausgeht, daß der Peak II-Rezeptor ein Teil des Peak I-Rezeptors ist. Aufgrund des Bandenmusters von Peak II in Abb. 35 B könnte man postulieren, daß der Peak II-Rezeptor die Struktur $(\alpha\beta)$ besitzt (entsprechend Bande 5 mit MG 210.000). Diese Interpretation kollidiert aber mit dem Bandenmuster von Peak II in Abb. 35 C, in dem die höhermolekularen Banden 1a - 4 auftreten, und sie stimmt auch nicht mit der

mittels Gelfiltration bestimmten Größe des Peak II-Rezeptors überein. Schließlich ist die Übertragbarkeit des $(\alpha\beta)_2$-Modells auch aus einem dritten Grund fraglich: im Bandenmuster von Peak II (Abb. 35 B und C) liegen Bande 5 und 7 auch schon im nichtreduzierten Zustand nebeneinander vor. Nach dem $(\alpha\beta)_2$-Modell sollte die Bildung von α aus $(\alpha\beta)$ jedoch nur durch Reduktion möglich sein.

Aus diesem gleichzeitigen Auftreten von Bande 5 und 7 läßt sich noch ein anderer Schluß ziehen: da Bande 7 durch Reduktion aus Bande 5 entsteht, muß der Anteil von Bande 7, der schon im nichtreduzierten Zustand auftritt, als Untereinheit neben Bande 5 von vornherein im Rezeptor von Peak II enthalten sein und zwischen diesen beiden Untereinheiten müssen nichtkovalente (durch SDS lösbare) Bindungen bestehen.

Faßt man abschließend alle Ergebnisse und Überlegungen zusammen, so ergibt sich folgendes Bild vom Insulinrezeptor:

Aufgrund der in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen läßt sich noch kein Gesamtmodell für den Rezeptor aufstellen, auch die in der Literatur diskutierten Modelle lassen sich nur in Teilaspekten mit den eigenen Befunden vereinbaren. Einige Hypothesen können dennoch aufgestellt werden:

1) Der Rezeptor von Peak II ist ein Teil des Peak I-Rezeptors.
2) Der Peak I-Rezeptor besteht aus einem nicht-insulinbindenden Effektoranteil und einem Rezeptoranteil, die vermutlich über Disulfidbindung miteinander verknüpft sind.
3) Der Effektoranteil unterdrückt im Peak I-Rezeptor die Insulinbindung bei pH 7,2 und niedriger Ionenstärke.
4) Die Bindungsstelle des Peak I-Rezeptors und die Bindungsstelle des Peak II-Rezeptors mit hochionischem Bindungsoptimum gleichen sich oder sind sich ähnlich.
5) Die Untereinheiten der Rezeptoren von Peak I und Peak II werden außer durch Disulfidbrücken auch durch starke nichtkovalente Bindungen zusammengehalten, die erst bei SDS-Behandlung aufbrechen.

Ungeklärt bleiben unter anderem folgende Fragen:

1) Besitzt der Rezeptor von Peak II eine oder zwei verschiedene Sorten von Bindungsstellen?
2) Wie kommen die unterschiedlichen Bandenmuster von Peak II in der SDS-PAGE je nach den pH- und Ionenstärkebedingungen bei der Photoaffinitätsmarkierung zustande?
3) Welche Bedeutung haben die nichtlinearen Scatchard-Diagramme: negative Kooperativität, pH- und Ionenstärke-induzierte oder echte Heterogenität der Bindungsstellen?
4) Wie sind die mittels Gelfiltration und mittels SDS-PAGE gefundenen Molekulargewichte miteinander korreliert?

Diese und eine Reihe anderer Fragen müssen in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

7. ZUSAMMENFASSUNG

1) Der Insulinrezeptor aus Rattenleber wurde mit Triton X-100 aus den Membranen herausgelöst und mittels Gelfiltration an Sepharose 4B CL, Behandlung mit Con A-Sepharose und Fällung mit Con A partiell gereinigt. Bei der Auftrennung des Membranextrakts über Gelfiltration erhielt man neben einem Proteinpeak, der den Hauptteil des Extraktproteins enthielt, und einem Abbaupeak, der die Insulin-Abbauaktivität enthielt, 3 Bindungspeaks: 2 Rezeptorpeaks (Peak I und Peak II) sowie einen Bindungspeak, der in der gleichen Position wie der Abbaupeak eluiert wurde und der spezifischen Bindung eines oder mehrerer insulinabbauender Enzyme zugeschrieben wurde. Die Behandlung des Extrakts mit Con A-Sepharose wurde im Batch-Verfahren durchgeführt. Der Rezeptor wurde im Gegensatz zum Hauptteil des Extraktproteins und der Insulin-Abbauaktivität an Con A-Sepharose gebunden und ließ sich durch 0,3 M MeMan wieder eluieren. Der Rezeptor konnte auch direkt durch Con A aus Membranextrakt gefällt werden. Nach Abzentrifugieren des Präzipitats ließ er sich aus diesem ebenfalls mit 0,3 M MeMan wieder eluieren. Der Hauptteil des Extraktproteins und die Insulin-Abbauaktivität wurden nicht durch Con A gefällt und liessen sich so abtrennen.

2) Die mittels Gelfiltration erhaltenen beiden Rezeptoraktivitäten (Peak I und Peak II) wurden näher charakterisiert. Molekulargewichtsbestimmung an Sepharose 4B CL und 6B CL ergab für Peak I einen Stokes'Radius von 91 Å und ein Molekulargewicht um 800.000, für Peak II einen Stokes'Radius von 79 Å und ein Molekulargewicht von 610.000. Peak I besaß bei 4°C ein Bindungsoptimum bei pH 8,0 und hoher Ionenstärke und zeigte bei niedriger Ionenstärke keine Insulinbindung. Peak II dagegen besaß bei 4°C 2 Bindungsoptima: ein 'niederionisches Optimum' bei pH 7,2 und niedriger Ionenstärke und ein 'hochionisches Optimum' wie Peak I bei pH 8,0 und hoher Ionenstärke. Die Insulinbin-

dung war besonders am niederionischen Optimum stark temperaturabhängig. Bis auf wenige Ausnahmen (bei pH 7,4 und hoher Ionenstärke) erhielt man für die Bindung von Peak I und Peak II nichtlineare Scatchard-Diagramme, die sich in einen hochaffinen und einen niederaffinen Bindungsanteil zerlegen ließen. Die Dissoziationskonstanten beider Bindungsanteile waren pH- und Ionenstärke-abhängig. Für den hochaffinen Bindungsanteil betrugen sie unter optimalen Bedingungen (s.o.) $7{,}8 \cdot 10^{-10}$ M (Peak I), $7{,}8 \cdot 10^{-10}$ M (Peak II am niederionischen Optimum) und $1{,}89 \cdot 10^{-9}$ M (Peak II am hochionischen Optimum).

3. Peak I und Peak II wurden mit $N^{\varepsilon B29}$-Mono(4-Azidobenzoyl)-^{125}J-Insulin (^{125}J-MABI) photoaffinitätsmarkiert und mittels Gelfiltration und SDS-PAGE untersucht. Die markierten Peaks zeigten bei Gelfiltration dasselbe Elutionsverhalten wie die unmarkierten Peaks. In der SDS-PAGE erhielt man für Peak I 5 Banden mit MG 407.000, 365.000, 325.000, 280.000 und 245.000. Peak II zeigte, wenn er am niederionischen Optimum photoaffinitätsmarkiert wurde, 2 Hauptbanden mit MG 210.000 und 132.000. Wurde er am hochionischen Optimum markiert, zeigte er zusätzlich die genannten Banden von Peak I. Bei schwacher Reduktion traten umgekehrt bei Peak I die Banden von Peak II auf. Bei starker Reduktion erhielt man für beide Peaks nur noch die Bande mit MG 132.000 sowie eine Nebenbande mit MG 120.000.

4. Aufgrund der verschiedenen Übereinstimmungen zwischen Peak I und Peak II bezüglich Struktur und Bindungseigenschaften wurde geschlossen, daß die Rezeptorspezies von Peak II ein Teil der Rezeptorspezies von Peak I ist. Als Differenzstück zwischen beiden wurde ein nicht-insulinbindender Effektoranteil angenommen, der über Disulfidbrücken mit Peak II verknüpft ist und die Insulinbindung von Peak I bei pH 7,2 und niedriger Ionenstärke unterdrückt.

8. LITERATUR

1. Ansorge, S., Kirschke, H., Köhler, E., Langner, J., Römer, I., Wiederanders, B. (1977), Acta biol. med. germ. 36, 1713-1721
2. Baldwin, D., Terris, S., Steiner, D.F. (1980), J. Biol. Chem. 255, 4028-4034
3. Bergeron, J.J.M., Evans, W.H., Geschwind, I.I. (1973), J. Cell Biol. 59, 771-776
4. Bergeron, J.J.M., Sikstrom, R., Hand, A.R., Posner, B.I. (1979), J. Cell Biol. 80, 427-443
5. Blackard, W.G., Guzelian, P.S., Small, M.E. (1978), Endocrinology 103, 548-553
6. Blackard, W.G., Small, E., Ludeman, C. (1980), Metabolism 29, 691-697
7. Blanchard, R.F., Davis, P.J., Blas, S.D. (1978), Diabetes 27, 88-95
8. Blundell, T. (1979), TIBS 4, 51-54
9. Brush, J.S. (1977), Biochem. Pharmacol. 26, 2349-2354
10. Capeau, J., Picard, J., Caron, M. (1978), Cancer Res. 38, 3930-3937
11. Capeau, J., Picard, J. (1980), FEBS Letters 118, 25-30
12. Caron, M., Picard, J., Kern, P. (1978), Biochim. Biophys. Acta 512, 29-40
13. Carpentier, J.-L., Gorden, P., Freychet, P., Le Cam, A. (1979), J. Clin. Invest. 63, 1249-1261
14. Carter-Su, C., Pilch, P.F., Czech, M.P. (1981), Biochemistry 20, 216-221
15. Clark, S., DeLuise, M., Larkins, R.G., Melick, R.A., Harrison, L.C. (1978), Biochem. J. 174, 37-43
16. Clarke, S. (1975), J. Biol. Chem. 250, 5459-5469
17. Cuatrecasas, P., Desbuquois, B., Krug, F. (1971), Biochem. Biophys. Res. Commun. 44, 333-339
18. Cuatrecasas, P. (1971), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 68, 1264-1268
19. Cuatrecasas, P. (1971), J. Biol. Chem. 246, 7265-7274
20. Cuatrecasas, P. (1972), J. Biol. Chem. 247, 1980-1991
21. Cuatrecasas, P. (1972), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 318-322
22. Cuatrecasas, P. (1972), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 1277-1281
23. Cuatrecasas, P., Tell, G.P.E. (1973), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70, 485-489

24. Cuatrecasas, P. (1973), J. Biol. Chem. 248, 3528-3534

25. Cuatrecasas, P., Hollenberg, M.D. (1976), Adv. Protein Chem. 30, 251-451

26. Czech, M.P. (1977), Ann. Rev. Biochem. 46, 359-384

27. Czech, M.P. (1980), Diabetes 29, 399-409

28. Czech, M.P., Massague, J., Pilch, P.F., Carter-Su, C. (1980), Ann. N. Y. Acad. Sci. 358, 282 - 291

29. Czech, M.P. (1981), Am. J. Med. 70, 142-150

30. De Meyts, P., Roth, J., Neville, D.M., Gavin, J.R., Lesniak, M.A. (1973), Biochem. Biophys. Res. Commun. 55, 154-161

31. De Meyts, P., Gavin, J.R., Roth, J., Neville, D.M. (1974), Diabetes 23 (Suppl. I), 355

32. De Meyts, P., Bianco, A.R., Roth, J. (1976), J. Biol. Chem. 251, 1877-1888

33. De Meyts, P., Van Obberghen, E., Roth, J., Wollmer, A., Brandenburg, D. (1978), Nature 273, 504-509

34. De Zoeten, L.W., De Bruin, O.A. (1961), Rec. Trav. Chim. 80, 907-916

35. Donner, D.B. (1980), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 3176-3180

36. Duckworth, W.C., Stentz, F.B., Heinemann, M., Kitabchi, A.E. (1979), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 635-639

37. Duckworth, W.C., (1979), Endocrinology 104, 1758-1764

38. Fairbanks, G., Steck, T.L., Wallach, D.F.H. (1971), Biochemistry 10, 2606-2617

39. Flier, J.S., Kahn, C.R., Roth, J. (1979), N. Engl. J. Med. 300, 413-419

40. Freychet, P., Kahn, R., Roth, J., Neville, D.M. (1972), J. Biol. Chem. 247, 3953-3961

41. Freychet, P. (1976), Diabetologia 12, 83-100

42. Fussganger, R.D., Kahn, C.R., Roth, J., De Meyts, P. (1976), J. Biol. Chem. 251, 2761-2769

43. Galardy, R.E., Craig, L.C., Jamieson, J.D., Printz, M.P. (1974), J. Biol. Chem. 249, 3510-3518

44. Gavin, J.R., Roth, J., Neville, D.M., De Meyts, P. (1974), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71, 84-88

45. Ginsberg, B.H., Kahn, C.R., Roth, J., De Meyts, P. (1976), Biochem. Biophys. Res. Commun. 73, 1068-1074

46. Ginsberg, B.H., Cohen, R.M., Kahn, C.R., Roth, J. (1978), Biochim. Biophys. Acta 542, 88-100

47. Goidl, J.A. (1979), Biochemistry 18, 3674-3679

48. Goldfine, I.D., Smith, G.J. (1976), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 1427-1431

49. Gorden, P., Kahn, C.R., Flier, J., Bar, R.S., Roth, J. (1978), Proc. FEBS Meet. 45, 239-247

50. Gorden, P., Carpentier, J.-L., Freychet, P., Orci, L. (1980), Diabetologia 18, 263-274

51. Grodzki, K. (1980), Diplomarbeit, Universität Tübingen

52. Hammons, G.T., Jarett, L. (1980), Diabetes 29, 475-486

53. Hara, H., Hidaka, H., Kosmakos, F.C., Mott, D.M., Vasquez, B., Howard, B.V., Bennett, P.H. (1981), J. Clin. Endocrinol. Metab. 52, 17-22

54. Harmon, J.T., Kahn, C.R., Kempner, E.S., Schlegel, W. (1980), J. Biol. Chem. 255, 3412-3419

55. Harrison, L.C., Billington, T., East, I.J., Nichols, R.J., Clark, S. (1978), Endocrinology 102, 1485-1495

56. Harrison, L.C., Flier, J.S., Roth, J., Karlsson, F.A., Kahn, C.R. (1979), J. Clin. Endocrinol. Metab. 48, 59-65

57. Harrison, L.C., Itin, A. (1980), J. Biol. Chem. 255, 12066-12072

58. Harrison, L.C., Kahn, C.R. (1980), Progr. Clin. Immunol. 4, 107-125

59. Heinrich, J., Pilch, P.F., Czech, M.P. (1980), J. Biol. Chem. 255, 1732-1737

60. Helenius, A., Simons, K. (1972), J. Biol. Chem. 247, 3656-3661

61. Hepp, K.D. (1977), Diabetologia 13, 177-186

62. Herzberg, V., Boughter, J.M., Carlisle, S., Hill, D.E. (1980), Nature 286, 279-281

63. Hofmann, C., Marsh, J.W., Miller, B., Steiner, D.F. (1980), Diabetes 29, 865-874

64. Horvat, A. (1978), J. Cell. Physiol. 97, 37-48

65. Hunter, W.M., Greenwood, F.C. (1962), Nature 194, 495-496

66. Insulin Research Group, Peking (1977), Scientia Sinica 20, 794-802

67. Jacobs, S., Shechter, Y., Bissell, K., Cuatrecasas, P. (1977), Biochem. Biophys. Res. Commun. 77, 981-988

68. Jacobs, S., Hazum, E., Shechter, Y., Cuatrecasas, P. (1979), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 4918-4921

69. Jacobs, S., Hazum, E., Cuatrecasas, P. (1980), J. Biol. Chem. 255, 6937-6940

70. Jacobs, S., Hazum, E., Cuatrecasas, P. (1980), Biochem. Biophys. Res. Commun. 94, 1066-1073

71. Jacobs, S., Cuatrecasas, P. (1980), J. Clin. Invest. 66, 1424-1427

72. Jarett, L. (1979), Human Pathology 10, 301-311

73. Kabuto, M., Suzuki, K., Ohsawa, N., Kosaka, K. (1977), Endocrinol. Japon. 24, 173-178

74. Kahn, C.R., Freychet, P., Roth, J. (1974), J. Biol. Chem. 249, 2249-2257

75. Kahn, C.R. (1976), J. Cell Biol. 70, 261-286

76. Kahn, C.R., Baird, K.L., Jarrett, D.B., Flier, J.S. (1978), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 4209-4213

77. Kahn, C.R. (1980), Metabolism 29, 455-466

78. Kasuga, M., Tsushima, T., Akanuma, Y., Kosaka, K. (1979), Diabetologia 17, 311-318

79. Katzen, H.M., Soderman, D.D., Green, B.G. (1981), Biochem. Biophys. Res. Commun. 98, 410-416

80. Kemmler, W., Renner, R., Zynamon, A., Hepp, K.D. (1978), Biochim. Biophys. Acta 543, 349-356

81. Kiechle, F.L., Jarett, L., Popp, D.A., Kotagal, N. (1980), Diabetes 29, 852-855

82. Klotz, I.M., Hunston, D.L. (1971), Biochemistry 10, 3065-3069

83. Klotz, K.-N. (1979), Diplomarbeit, Universität Tübingen

84. Koch, R. (1978), Diplomarbeit, Universität Tübingen

85. Koch, R., Weber, U. (1981), Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 362, 347-351

86. Kosmakos, F.C., Roth, J. (1980), J. Biol. Chem. 255, 9860-9869

87. Krupp, M.N., Livingston, J.N. (1978), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 2593-2597

88. Krupp, M.N., Livingston, J.N. (1979), Nature 278, 61-62

89. Krupp, M.N., Livingston, J.N. (1980), Endocrinology 106, 179-184

90. Kuehn, L., Meyer, H., Rutschmann, M., Thamm, P..(1980), FEBS Letters 113, 189-192

91. Laemmli, U.K. (1970) Nature 227, 680-685

92. Lang, U., Kahn, C.R., Harrison, L.C. (1980), Biochemistry 19, 64-70

93. Lang, U., Kahn, C.R., Chrambach, A. (1980), Endocrinology 106, 40-49

94. Larner, J., Galasko, G., Cheng, K., DePaoli-Roach, A.A., Huand, L., Daggy, P., Kellogg, J. (1979), Science 206, 1408-1410

95. Latner, A.L., Hodson, A.W. (1980), Anal. Biochem. 101, 483-487

96. Le Maire, M., Rivas, E., Møller, J.V. (1980), Anal. Biochem. 106, 12-21

97. Livingston, J.N., Purvis, B.J. (1980), Am. J. Physiol. 238, E267-E275

98. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. (1951), J. Biol. Chem. 193, 265-275

99. Marchmont, R.J., Houslay, M.D. (1980), FEBS Letters 118, 18-24

100. Marshall, S., Olefsky, J.M. (1979), J. Biol. Chem. 254, 10153-10160

101. Marshall, S., Olefsky, J.M. (1980), J. Clin. Invest. 66, 763-772

102. Marshall, S., Olefsky, J.M. (1980), Endocrinology 107, 1937-1945

103. Massague, J., Czech, M.P. (1980), Diabetes 29, 945-947

104. Maturo, J.M., Shackelford, W.H., Hollenberg, M.D. (1978), Life Sci. 23, 2063-2072

105. Maturo, J.M., Hollenberg, M.D. (1978), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 3070 - 3074

106. Maturo, J.M., Hollenberg, M.D. (1979), Can. J. Biochem. 57, 497-506

107. Momoi, T. (1979), Biochem. Biophys. Res. Commun. 87, 541-549

108. Müller, G. (1980), Diplomarbeit, Universität Tübingen

109. Nakao, K., Kagawa, S., Murakoso, K., Hata, M., Matsuoka, A. (1980), Endocrinol. Japon. 27, 1-11

110. Nichol, L.W., Smith, G.D., Ogston, A.G. (1969), Biochim. Biophys. Acta 184, 1-10

111. Nozaki, Y., Schechter, N.M., Reynolds, J.A., Tanford, C. (1976), Biochemistry 15, 3884-3890

112. Offord, R.E., Philippe, J., Davis, J.G., Halban, P.A., Berger, M. (1979), Biochem. J. 182, 249-251

113. Olefsky, J.M. (1976), Diabetes 25, 1154-1162

114. Olefsky, J.M., Chang, H. (1978), Diabetes 27, 946-958

115. Olefsky, J.M., Chang, H. (1979), Endocrinology 104, 462-466

116. Ozaki, S., Kalant, N. (1977), J. Lab. Clin. Med. 90, 686-699

117. Pilch, P.F., Czech, M.P. (1979), J. Biol. Chem. 254, 3375-3381

118. Pilch, P.F., Czech, M.P. (1980), J. Biol. Chem. 255, 1722-1731

119. Pollet, R.J. Standaert, M.L., Haase, B.A. (1977), J. Biol. Chem. 252, 5828-5834

120. Posner, B.I., Patel, B., Verma, A.K., Bergeron, J.J.M. (1980), J. Biol. Chem. 255, 735-741

121. Pullen, R.A., Lindsay, D.G., Wood, S.P., Tickle, I.J., Blundell, T.L., Wollmer, A., Krail, G., Brandenburg, D., Zahn, H., Gliemann, J., Gammeltoft, S. (1976), Nature 259, 369-373

122. Reed, B.C., Lane, M.D. (1980), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 285-289

123. Richterich, R. (1968), Klinische Chemie, 2. Auflage, S. 243, Akademische Verlagsgesellschaft, Frankfurt/M.

124. Sahyoun, N., Hock, R.A., Hollenberg, M.D. (1978), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 1675-1679

125. Scatchard, G. (1949), Ann. N. Y. Acad. Sci. 51, 660-672

126. Schlessinger, J., Shechter, Y., Willingham, M.C., Pastan, I. (1978), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 2659-2663

127. Schlessinger, J., Van Obberghen, E., Kahn, C.R. (1980), Nature 286, 729-731

128. Schweitzer, J.B., Smith, R.M., Jarett, L. (1980), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 4692-4696

129. Seals, J.R., Jarett, L. (1980), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 77-81

130. Shafie, S.M., Cech, J.M., Livingston, J.N., Hilf, R. (1979), Cancer Biochem. Biophys. 4, 51-57

131. Silhavy, T.J., Szmelcman, S., Boos, W., Schwartz, M. (1975), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 2120-2124

132. Steiner, D.F. (1977), Diabetes 26, 322-341

133. Summ, H.-D., Schiemann, H., Volkmann, H.-D. (1976), Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 357, 683-693

134. Taylor, S.I. (1975), Biochemistry 14, 2357-2361

135. Terris, S., Steiner, D.F. (1975), J. Biol. Chem. 250, 8389-8398

136. Van Obberghen, E., Kasuga, M., Le Cam, A., Hedo, J.A., Itin, A., Harrison, L.C. (1981), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 1052-1056

137. Varandani, P.T. (1973), Biochim. Biophys. Acta 304, 642-659

138. Vigneri, R., Pliam, N.B., Cohen, D.C., Pezzino, V., Wong, K.Y., Goldfine, I.D. (1978), J. Biol. Chem. 253, 8192-8197

139. Waelbroeck, M., Van Obberghen, E., De Meyts, P. (1979), J. Biol. Chem. 254, 7736-7740

140. Williams, P.F., Turtle, J.R. (1979), Biochim. Biophys. Acta 579, 367-374

141. Wisher, M.H., Baron, M.D., Jones, R.H., Sönksen, P.H. (1980), Biochem. Biophys. Res. Commun. 92, 492-498

142. Xiaozhou, S. (1979), Scientia Sinica 22, 565-572

143. Yeung, C.W.T., Moule, M.L., Yip, C.C. (1980), Biochemistry 19, 2196-2203

144. Yip, C.C., Yeung, C.W.T., Moule, M.L. (1978), J. Biol. Chem. 253, 1743-1745

145. Yip, C.C., Yeung, C.W.T., Moule, M.L. (1980), Biochemistry 19, 70-76

146. Yip, C.C., Moule, M.L., Yeung, C.W.T. (1980), Biochem. Biophys. Res. Commun. 96, 1671-1678

147. Yokono, K., Imamura, Y., Shii, K., Sakai, H., Baba, S. (1981), Endocrinology 108, 1527-1532

Lebenslauf

Ich wurde am 19. Mai 1949 als erstes von drei Kindern des Magistratsrats Walter Koch und seiner Ehefrau Marianne Koch, geb. Heilig, in Kassel geboren.

Von 1955 bis 1959 besuchte ich die Volksschule in Kassel-Wilhelmshöhe. Anschließend wechselte ich auf das humanistische Friedrichsgymnasium in Kassel über, an dem ich im Juni 1967 das Abitur ablegte.

Von Oktober 1967 bis März 1969 leistete ich meinen Wehrdienst bei der Bundeswehr ab.

Ich begann im Sommersemester 1969 mit dem Studium der Biochemie an der Universität Tübingen. Im März 1970 bestand ich den ersten Teil, im April 1972 den zweiten Teil der Diplom-Vorprüfung.

Im Wintersemester 1971/72 nahm ich außerdem das Studium der Mathematik an der Universität Tübingen auf und absolvierte im September 1974 die Diplom-Vorprüfung in diesem Fach.

Im September 1976 legte ich die mündliche Diplom-Hauptprüfung in Biochemie ab. Von November 1976 bis Januar 1978 fertigte ich am Physiologisch-chemischen Institut der Universität Tübingen in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. U. Weber meine Diplomarbeit an mit dem Thema "Untersuchungen zur Bindung von Insulin an den Insulinrezeptor aus Rattenlebermembranen: Ausarbeitung eines Radiorezeptortests".

Anschließend arbeitete ich bis Oktober 1981 bei Herrn Prof. Dr. U. Weber an der vorliegenden Dissertation zum Thema "Partielle Reinigung und Charakterisierung des Insulinrezeptors aus Rattenlebermembranen".

Druck und Gesamtherstellung:
H. Hummel, Herderstraße 74
7410 Reutlingen, Telefon: 07121/230706